

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di

MEDICINA ANIMALE PRODUZIONI e SALUTE

Corso di laurea a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

**Gestione della mastite ed uso razionale degli
antimicrobici nell'allevamento della bovina da
latte: risultati preliminari**

Relatore:

Prof. Matteo Giancesella

Correlatori:

Dott.ssa Rossella Tessari

Dott. Antonio Barberio

Dott.ssa Eliana Schiavon

Laureando:

Luca Barin

Matricola n. 1119010

ANNO ACCADEMICO

2019/2020

Sommario

Riassunto.....	4
Abstract.....	5
1. Premessa.....	6
2.Introduzione.....	7
2.1 Anatomia della ghiandola mammaria	7
2.2 Sistemi di difesa della ghiandola mammaria	8
2.2.1 Immunità aspecifica	8
2.2.1 Immunità specifica	11
2.3 Patogenesi.....	11
2.3.1 Invasione	12
2.3.2 Infezione	12
2.3.3 Infiammazione	13
2.4 Epidemiologia	13
2.5 Classificazione	14
2.5.1 Classificazioni in base alla forma clinica.....	15
2.5.2 Classificazioni in base alla forma anatomopatologica	16
2.5.3 Classificazioni in base all'agente eziologico	17
2.6 Organismi patogeni	18
2.6.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.6.2 <i>Streptococcus agalactiae</i>	20
2.6.3 <i>Mycoplasma bovis</i>	21
2.6.4 <i>Prototheca spp</i>	22
2.6.5 <i>Streptococcus uberis</i>	23
2.6.6 Altri patogeni	24
2.7 Diagnosi.....	25
2.7.1 Diagnosi diretta	25
2.7.2 Diagnosi indiretta	27
2.8 Prevenzione e terapia	30
2.8.1 Prevenzione.....	31
2.8.2 Terapia antibiotica	33
2.8.3 Terapia di supporto.....	40
3. Obbiettivi dello studio.....	42
4. Materiali e metodi	43
4.1. Selezione delle aziende in funzione dell'agente eziologico di mastite	43

4.2. Aziende ed Animali	43
4.3. Disegno sperimentale	44
4.4 Coltura batterica	46
4.5 Minima concentrazione inibente (MIC)	48
4.6 Elaborazione dati ed analisi statistica	48
5. Risultati	49
5.1 Azienda A	53
5.2 Azienda B	59
5.3 Azienda C	62
6. Discussione	66
6.1 Prevalenza	66
6.2 MIC	67
7. Conclusioni	70
8. Bibliografia	71
9. Fonti normative	85
10. Sitografia	86

Riassunto

Le mastiti sono le patologie che causano maggiori perdite economiche e uso considerevole di antimicrobici nell'allevamento della bovina da latte. La diagnostica e la tracciabilità sono in grado di ridurre questo fenomeno, riducendo conseguentemente lo sviluppo di antimicrobico resistenza (AMR), uno dei maggiori pericoli verso la salute umana e animale. L'obiettivo di questo studio è la valutazione della prevalenza e dell'antimicrobico resistenza dei principali patogeni contagiosi (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Prototheca*) e di *S. uberis* in alcuni allevamenti intensivi del Veneto. Sono state campionate 944 bovine provenienti da tre differenti aziende. Tra gli animali oggetto di studio, 6 (0,6%) sono risultate positive a *S. aureus*, 88 (9%) a *S. agalactiae*, 27 (3%) a *Prototheca* e 6 (0,6%) a *S. uberis*. I risultati della MIC hanno mostrato come *S. aureus* fosse il patogeno maggiormente resistente mentre *S. uberis* e *S. agalactiae* hanno mostrato una resistenza modesta. Di notevole importanza è risultato l'isolamento nell'azienda A di un ceppo di *S. aureus* Meticillino-Resistente (MRSA), patogeno di fondamentale importanza e pericolosità per la salute pubblica. I risultati di questo studio potrebbero indicare un possibile adattamento ambientale di *S. agalactiae*, che spiegherebbe la sua elevata prevalenza rispetto agli altri patogeni contagiosi. Tali dati potrebbero inoltre aiutare a sviluppare dei protocolli sanitari al fine di ridurre la presenza di mastiti ed i fenomeni di antimicrobico resistenza.

Abstract

Mastitis cause the greatest economic losses and considerable use of antimicrobials in dairy farming. Diagnostics and traceability can reduce this phenomenon, consequently reducing the development of antimicrobial resistance (AMR), one of the major dangers in human and animal health. The objective of this study is to evaluate the prevalence and antimicrobial resistance of the main contagious pathogens (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Prototheca*) and *S. uberis* in some intensive farms in the Veneto region. 944 cows from three different farms were sampled. Among the animals studied, 6 (0.6%) tested positive for *S. aureus*, 88 (9%) for *S. agalactiae*, 27 (3%) for *Prototheca* and 6 (0.6%) for *S. uberis*. MIC results showed that *S. aureus* was the most resistant pathogen while *S. uberis* e and *S. agalactiae* showed modest resistance. The isolation in farm A of a strain of Methicillin-Resistant *S. aureus* (MRSA) was relevant, because it's a pathogen of fundamental importance and a danger to public health. The results of this study could indicate a possible environmental adaptation of *S. agalactiae*, which would explain its high prevalence compared to other contagious pathogens. These data could also help to develop health protocols in order to reduce the presence of mastitis and the antimicrobial resistance.

1. Premessa

La mastite viene definita come “l’infiammazione della ghiandola mammaria, includendo non solo il tessuto intramammario ma anche strutture correlate come capezzoli, areole, dotti galattofori. In medicina veterinaria viene definita mastite una reazione infiammatoria intramammaria causata da un agente infettivo” (Contreras and Rodriguez, 2011). Più comunemente la mastite viene intesa come un’infiammazione del solo parenchima mammario qualunque sia l’eziologia (Constable et al, 2016).

L’infezione intramammaria (IMI), negli allevamenti zootecnici di bovine ad elevata produzione latte, è considerata una delle principali problematiche in tutto il mondo. Infatti, colpisce almeno il 25% degli animali in lattazione ed è causa di ingenti perdite economiche (Zecconi and Zanirato, 2013; Constable et al, 2016). Il drastico calo della produzione latte, il costo dei trattamenti, le spese mediche-veterinarie, le ingenti quantità di latte escluso dalla filiera agro-alimentare a causa dei tempi di sospensione dei trattamenti antibiotici ed antiinfiammatori, l’aumento della riforma e il calo delle performance riproduttive dovute alle infezioni della ghiandola mammaria, esitano in gravi perdite monetarie per gli allevatori (Schrick, 2001). È dimostrato che le infezioni mammarie sono causa di riduzione di benessere e longevità delle bovine (Heikkilä et al, 2012), e questo può avere delle forti ripercussioni sulla produzione latte.

Inoltre, per affrontare il sempre più rilevante fenomeno dell’antimicrobico resistenza (Multiple drug resistance- MDR) è necessario approntare negli allevamenti nuovi programmi e protocolli terapeutici che valutino le resistenze dei patogeni e dell’efficacia delle varie terapie.

Nonostante questo, i dati epidemiologici riguardanti le mastiti e l’antimicrobico resistenza in Italia sono pochi e datati (Zecconi et al, 2020).

Per tutti questi motivi, le mastiti rimangono uno dei principali e complessi problemi da affrontare nell’allevamento della bovina da latte e sono necessari degli studi che permettano lo sviluppo di protocolli sanitari al fine di affrontare queste patologie.

L’obiettivo di questa Tesi è valutare la prevalenza e l’antimicrobico resistenza dei principali patogeni presenti negli allevamenti zootecnici di bovine da latte del Veneto (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Prototheca*, *S. uberis*) al fine di sviluppare protocolli per rendere razionale l’uso degli antibiotici.

2.Introduzione

2.1 Anatomia della ghiandola mammaria

La ghiandola mammaria del bovino è composta da un corpo mammillare semisferico costituito da quattro complessi mammari, ognuno dotato di un capezzolo. Questi vengono generalmente chiamati *quarti* e sono strutture indipendenti che non hanno comunicazione tra loro (Smith, 2015). Capezzoli e quarti sono divisi in due quarti anteriori e due quarti posteriori e ulteriormente classificati in quarto destro o sinistro. La mammella del bovino è ancorata alla parete ventrale addominale attraverso un complesso legamentoso chiamato apparato sospenditore della mammella (Nickel et al, 1992). I foglietti legamentosi avvolgono i quarti singolarmente, in modo da esercitare minor pressione possibile sul parenchima ghiandolare. Ogni quarto può essere considerato una ghiandola mammaria indipendente (Barkema et al, 1997) e consiste in un capezzolo, una cisterna del capezzolo, una cisterna vera e propria all'interno della mammella, un sistema di dotti e tessuto ghiandolare secretorio (Smith, 2015).

I capezzoli hanno un singolo dotto papillare che comunica con la cavità denominata cisterna del capezzolo; la cisterna del capezzolo è in comunicazione con la cisterna ghiandolare o seno galattoforo (cisterna del latte), suddivisa in compartimenti in cui sboccano i dotti lattiferi, canali che si approfondano nel parenchima mammario. La parte terminale dei dotti lattiferi si ramifica nei dotti escretori e si esaurisce nei segmenti ghiandolari terminali, la vera e propria parte secernente di struttura alveolare. (Nickel et al., 1992) Il parenchima ghiandolare è strutturato con un particolare tessuto spugnoso, derivante dalle infiltrazioni di tessuto connettivo che separa i lobi e i lobuli dei quarti.

I lobuli mammari sono formati da gruppi di adenomeri avvolti e separati da setti connettivali. Le cellule secernenti sono avvolte da cellule mioepiteliali che sotto l'influsso dell'ossitocina esercitano la loro attività contrattile al fine di comprimere le cellule alveolari ed eiettare il secreto verso il sistema duttale (Nickerson and Akers, 2011). I setti connettivali sono formati da tessuto connettivo lasso che contiene i plessi vascolari e linfatici fondamentali per la nutrizione della ghiandola inoltre, il connettivo è anche capace di una notevole estensione, che permette alla mammella di espandersi notevolmente in fase di lattazione (Dellman and Eurell, 2012).

2.2 Sistemi di difesa della ghiandola mammaria

In una bovina sana la ghiandola mammaria presenta multipli sistemi di difesa contro l'ingresso dei patogeni. A parte alcuni rari casi le infezioni intramammarie sono tutte causate da patogeni ascendenti che penetrano attraverso il canale del capezzolo (Blowey and Edmondson, 2010).

Il sistema immunitario della bovina presenta due principali linee di difesa (Marshall et al., 2018):

- L'immunità innata (o aspecifica), che si può dividere ulteriormente in:
 1. Barriere anatomiche
 2. Barriere fisiologiche
 3. Barriere infiammatorie
 4. Barriere endocitiche e fagocitiche
- L'immunità acquisita (o specifica), divisa in:
 1. Risposta mediata da cellule T
 2. Risposta mediata da cellule B

2.2.1 Immunità aspecifica

Barriere anatomiche:

- La cute del capezzolo è la prima forma di difesa della mammella (Ezzat Alnakip et al., 2014) ed è formata da epitelio cheratinizzato pluristratificato. Questo rappresenta un ambiente ostile per i batteri ma in caso di lesioni può essere substrato per la colonizzazione batterica oppure una porta di ingresso per i patogeni, soprattutto in caso di *S. aureus*. In questo caso la cute della mammella diventa un reservoir per la trasmissione del patogeno (Petersson-Wolfe et al., 2010). Ripetute manovre di lavaggio (es. pre dipping) possono facilitare l'indebolimento e la rimozione di questo strato, di conseguenza le soluzioni per il post dipping contengono sostanze emollienti che facilitano la conservazione di questa specifica barriera (Blowey and Edmondson, 2010; Zecconi and Zanirato, 2013). Il canale del capezzolo è ricoperto da epidermide stratificata ricoperta da un sottile strato lipidico che ha delle proprietà antibatteriche simili a quelle della cute. Grazie alla contrazione del muscolo sfintere del capezzolo le pareti aderiscono e lo strato

lipidico completa la chiusura facendo in modo che non rimanga latte nel canale, poiché potrebbe essere una via di accesso per i patogeni (Smith, 2015).

Durante l'asciutta si forma, nel canale del capezzolo, un tappo di cheratina e cere che contribuisce ulteriormente a sigillare il canale.

Barriere fisiologiche:

- **Lattoferrina:** è una glicoproteina prodotta dalle cellule dell'epitelio mammario e dai neutrofili, che ha la capacità di legare il ferro necessario in particolar modo per la crescita dei coliformi (Smith, 2015). L'effetto batteriostatico della lattoferrina è decisamente maggiore in asciutta poiché in lattazione viene diluita dalla continua produzione di latte e inoltre gli alti livelli di citrati presenti nel secreto ghiandolare competono con la lattoferrina per il ferro, formando in tal modo citrato di ferro utilizzabile dai batteri (Chaneton et al., 2008; Blowey and Edmondson, 2010).
- **Lattoperossidasi:** enzima contenuto nel latte che in presenza di perossido di idrogeno e di tiocianato può inibire la crescita di alcuni batteri, in particolare Gram positivi, ed eliminarne i Gram negativi (Almehdar et al., 2015). Il tiocianato presente nel latte è dieta-dipendente mentre l' H_2O_2 è prodotta dai batteri, soprattutto alcuni Gram positivi (Blowey and Edmondson, 2010).

Barriere infiammatorie:

- **Sistema del complemento:** è un insieme di proteine sieriche che reagiscono in un sistema a cascata che risulta nell'eliminazione di alcuni batteri o nella facilitazione della fagocitosi (Rainard, 2003).
- **Le proteine sieriche tramite i *pathogen recognition receptors* (PRRs) si legano a molecole che sono presenti in molti agenti microbici ma non nell'ospite, chiamate *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs).** Una volta legate queste proteine, un tipo specifico di PRRs, i toll-like receptor (TLRs) evocano un'espressione di alcuni geni che codificano per il rilascio di citochine infiammatorie e di derivati dell'acido arachidonico che spesso causano gli effetti macroscopici locali e sistemici della mastite inoltre, questi mediatori causano un notevole afflusso di neutrofili (Ezzat Alnakip et al., 2014).
- **Anticorpi:** il loro ruolo è ancora parzialmente sconosciuto; si pensa che aiutino l'opsonizzazione dei batteri, facilitando così la fagocitosi. Difficilmente hanno un effetto protettivo.

Barriere endocitiche e fagocitiche:

Nel latte sono presenti diversi tipi cellulari; tra questi, i principali sono rappresentati dalle cellule epiteliali dei dotti e dalle cellule infiammatorie, che vengono considerati cellule somatiche (SC). Il conteggio delle cellule somatiche (SCC) è di fondamentale importanza nella valutazione delle IMI (Alhussien and Dang, 2018).

Le proporzioni delle cellule infiammatorie nel latte variano a seconda dello stato di salute della mammella e rappresentano un criterio differenziale tra quarto sano e malato (Tab 1, Ezzat Alnakip et al., 2014).

Comunque, tutte le cellule infiammatorie presenti nel latte hanno la capacità di eliminare i microrganismi in ingresso (Blowey and Edmondson, 2011).

Tabella 1: Distribuzione delle cellule somatiche nel latte sano e mastitico (da Ezzat Alnakip et al., 2014).

	Latte sano	Latte mastitico
SCC	Minore di 1×10^5 anche se è consigliato un valore cut-off di 2×10^5	Maggiore di 2×10^5 ma può arrivare anche a 1×10^6 nei casi più gravi
Leucociti	75% del SCC	Enorme aumento dovuto alla migrazione dei leucociti nel sito di infezione.
Macrofagi	35-79%	9-32%
Linfociti	10-28%	14-24%
Polimorfonucleati	3-26%	Oltre il 90%

I macrofagi e linfociti presenti hanno la principale funzione (insieme al sistema del complemento e ad altri mediatori prodotti dalle cellule epiteliali danneggiate) di evocare una risposta infiammatoria che richiama nella mammella e nel latte un elevato numero di granulociti neutrofili (Blowey and Edmondson, 2014).

Questi migrano dal sangue tramite diapedesi e vengono attivati da altre citochine proinfiammatorie (es. $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$) per diventare cellule killer. I neutrofili eliminano i batteri principalmente tramite fagocitosi. L'efficacia di eliminazione dei neutrofili nel latte rispetto al sangue è ridotta perché (Smith, 2015):

- Sono in numero molto minore rispetto ai neutrofili naturalmente presenti nel sangue.
- Scambiano le gocce lipidiche per i batteri e le fagocitano.
- Vengono ricoperti dalla caseina, che riduce le loro attività.
- I fattori antibatterici e proinfiammatori sono molto più diluiti nel latte rispetto al sangue.
- Spesso i patogeni obbligati hanno dei fattori di virulenza che li aiutano ad evadere il sistema immunitario.

2.2.1 Immunità specifica

Nel caso un microrganismo riesca a penetrare nella ghiandola ed a sopravvivere ai meccanismi di difesa dell'immunità aspecifica, viene reclutato il sistema dell'immunità specifica. I macrofagi, oltre alla fondamentale azione fagocitica (Kehrli and Harp, 2001), insieme alle cellule dendritiche processano e presentano l'antigene, mezzo fondamentale per la risposta citochinica (linfociti T, CD4+), per l'attivazione dei linfociti B (produzione anticorpale) e per l'attivazione dei linfociti T citotossici (CD8+). In risposta ad un'infezione intramammaria si innesca un rapido aumento di anticorpi dovuto alla produzione locale ma soprattutto all'aumento della permeabilità endoteliale che consente l'afflusso di Ig plasmatiche. Le IgM e IgG2 hanno un effetto opsonizzante (facilita la fagocitosi batterica) mentre le IgG1 e le IgA neutralizzano le tossine batteriche, causano l'agglutinazione dei batteri ed inoltre prevengono l'adesione dei microrganismi alle cellule endoteliali (Smith, 2015).

2.3 Patogenesi

Le mastiti sono provocate da infezioni ascendenti nella maggior parte dei casi (Blowey and Edmondson, 2010). La patogenesi delle mastiti rimane comunque un problema particolarmente complesso che può essere spiegato in tre fasi principali:

1. Invasione
2. Infezione
3. Infiammazione

2.3.1 Invasione

Il canale del capezzolo, nell'arco temporale che intercorre tra la mungitura del mattino e la mungitura serale, rimane sigillato da un tappo di cheratina, che possiede una blanda attività antimicrobica ed agisce anche come barriera fisica contro l'ingresso di microrganismi. Quando la bovina viene munta il tappo di cheratina viene rimosso. Inoltre, la procedura di mungitura lascia il muscolo sfintere del capezzolo in uno stato flaccido e può necessitare di alcuni minuti per ritornare al suo stato originario (Kehrli and Harp, 2001). Di conseguenza, ogni danno al capezzolo, in particolare alla punta, può predisporre a IMI (Seinhorst et al., 1991).

Nello specifico, sono presenti due vie di penetrazione nel canale del capezzolo (Blowey and Edmonson, 2010):

1. I patogeni giungono all'estremità del capezzolo e grazie a potenti fattori adesivi (*S. aureus* e *S. agalactiae*) colonizzano e si replicano in quella zona, risalendo poi nel canale del capezzolo.
2. I patogeni risalgono lungo il canale "spinti" da un'irregolare fluttuazione del vuoto della macchina di mungitura, che provoca un repentino flusso inverso di latte e permette quindi ai patogeni di colonizzare la ghiandola mammaria (Noorlander et al., 1981).

2.3.2 Infezione

L'infezione avviene quando i batteri entrano nella ghiandola mammaria attraverso il canale del capezzolo (Zhao e Lacasse, 2008). Per stabilire un'infezione, i batteri devono riuscire a superare le difese immunitarie della bovina (Sordillo and Streicher, 2002) viste in precedenza. Quando questo avviene, i batteri possono moltiplicarsi più o meno rapidamente e possono produrre endotossine (es. *E. coli*) le quali causano effetti sistemici gravi ma scarsi effetti infiammatori (Constable et al., 2016).

2.3.3 Infiammazione

Tendenzialmente quando avviene la fase di infiammazione si entra nella fase di mastite clinica. Gli effetti locali più frequenti sulla ghiandola mammaria sono rigonfiamento, dolorabilità, ipertermia e in alcuni casi particolari lesioni più gravi come necrosi, gangrena ed ascessi (Constable et al., 2016). Si può incorrere in un aumento massivo delle SCC e il tipo cellulare prevalente (oltre il 90% dei leucociti presenti nella ghiandola infiammata) sono i granulociti neutrofili. È fondamentale sottolineare che la gravità della mastite dipende da quanto rapido è l'arrivo dei neutrofili nel quarto infetto e qual è la loro abilità di eliminare i microrganismi patogeni.

I danni al tessuto della ghiandola mammaria avvengono sostanzialmente in tre modi (Zhao and Lacasse, 2008):

1. Produzione di esotossine ed endotossine da parte dei batteri.
2. Enzimi lisosomiali e ROS (reactive oxygen species) derivati dall'attività fagocitaria dei neutrofili o dalla morte degli stessi.
3. Proteasi e citochine rilasciate dalla risposta immunitaria.

2.4 Epidemiologia

La mastite bovina è la patologia più dispendiosa in ambito economico nell'industria lattiero-casearia (Gomes and Henriques, 2016).

Incidenza e prevalenza sono molto variabili e dipendenti da molteplici fattori, primo fra tutti l'igiene dell'allevamento zootecnico e della fase di mungitura (Verbeke et al., 2014) e possono variare anche in base al tipo di stabulazione e di lettiera (Constable et al., 2016).

Un'indagine, condotta in Brasile su 517 mandrie diverse nel 2015 (Busanello et al., 2017), mostra una prevalenza di mastiti subcliniche pari al 49,60% ($\pm 16,73\%$) e un'incidenza dello 0.191 (0.181-0.202).

In Etiopia, la prevalenza è stata riportata pari al 74,7% valutando la mandria mentre raggiungeva valori pari al 62,6% a livello di singola bovina (59,2% subcliniche e 3,4% cliniche). Dei campioni analizzati il 51,2% risultava positivo a *S. aureus* e questo patogeno è stato rilevato nel 73,2% delle mandrie affette da mastite (Abebe et al., 2016).

In Belgio, la prevalenza a livello di singola bovina è risultata essere del 40%; il 57,2% delle infezioni era causato da Stafilococchi non *aureus* mentre il 18% da *S. aureus*. *S. agalactiae* in Belgio è quasi eradicato, infatti è stato isolato solo nel 0,3% dei casi (Piepers et al., 2007).

In generale la prevalenza si aggira approssimativamente intorno al 50% delle vacche e dal 10% al 25% dei quarti colpiti. L'incidenza (casi clinici di almeno un quarto/100 vacche a rischio) varia dal 10% al 12% (Constable et al., 2016).

In letteratura sono presenti pochi dati inerenti alla situazione in Italia poiché la distribuzione delle mastiti è stata raramente oggetto di indagine. In uno studio epidemiologico effettuato dal 2000 al 2006 in provincia di Ragusa (Ferguson et al., 2007), il patogeno più isolato è stato *S. aureus* (22,6%), seguito da Stafilococchi non emolitici e Streptococchi ambientali (20,6% e 11,1%) con la lieve presenza di *S. agalactiae*, Coliformi e altri patogeni (2,3%, 2,9% e 5,8%).

Una delle ultime indagini effettuata in Italia su 160.000 quarti (Zecconi and Zanirato, 2013) è espressa nella Tab. 2:

Tabella 2: Principali patogeni isolati in Italia nel 2009 (da Zecconi e Zanirato, 2013).

Patogeno	Frequenza
<i>Streptococchi ambientali</i>	36%
SCN	31%
<i>S. aureus</i>	18%
Coliformi	9%
<i>S. agalactiae</i>	3%
<i>C. bovis</i>	2%
Altri	1%

2.5 Classificazione

Per agevolare la comprensione di una patologia così complessa sono stati sviluppati diversi sistemi classificativi, che si pongono l'obiettivo di inquadrare la patologia da differenti punti di vista. Un sistema comparativo è stato proposto da Contreras e Rodríguez (2011) al fine di fornire una classificazione comune per tutte le specie (Figura 1).

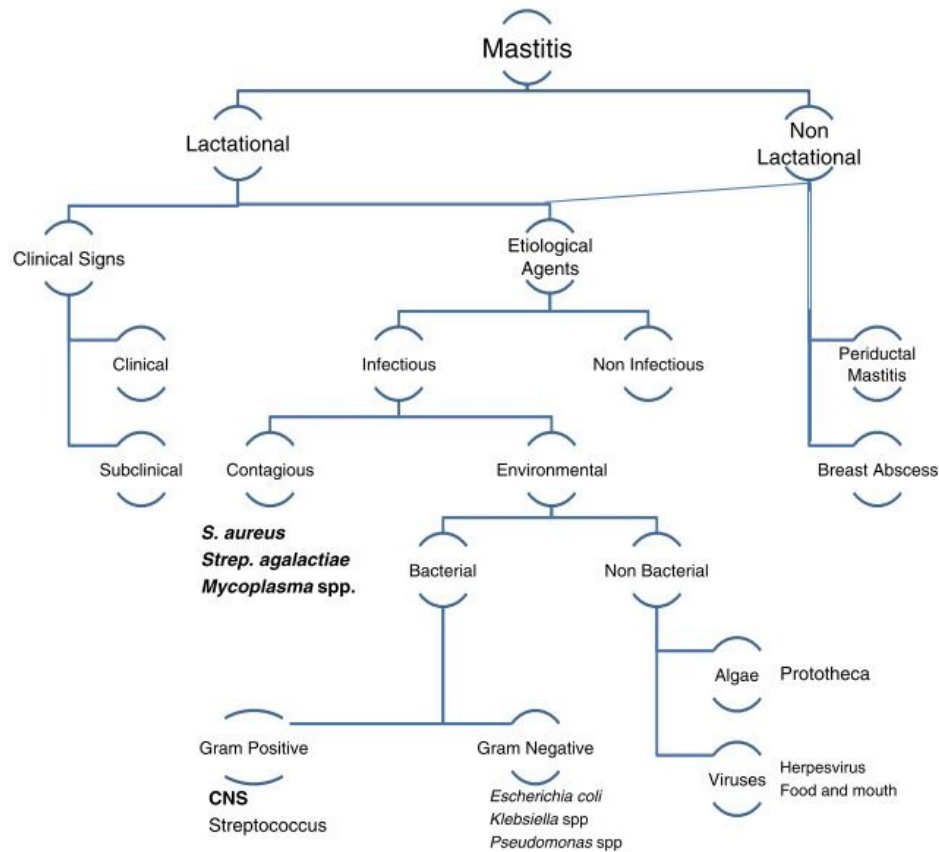


Figura 1: Classificazione delle mastiti (da Contreras e Rodrigues, 2011).

In medicina veterinaria vengono utilizzati principalmente questi sistemi classificativi:

- Classificazioni in base alla forma clinica
- Classificazioni in base alla forma anatomopatologica
- Classificazione in base all'agente eziologico

2.5.1 Classificazioni in base alla forma clinica

La classificazione clinica inquadra la risposta sistemica del bovino e le alterazioni della qualità del latte in seguito al processo infiammatorio. Distinguiamo quindi (Scott et al., 2011):

1. Mastite subclinica: il bovino non presenta segni clinici e risentimento sistemico. Possono esserci modifiche microscopiche di alcuni parametri del latte come l'aumento della conducibilità elettrica, aumento della SCC, aumento delle proteine di fase acuta

del latte (Constable et al., 2016; Martins et al., 2019). Inoltre, può essere rilevabile la presenza di batteri all'esame batteriologico.

2. Mastite clinica lieve (Grado I): La bovina continua a non mostrare alcun segno clinico mentre sono presenti delle alterazioni del latte visibili a livello macroscopico. Il latte può presentarsi con coaguli o flocculazioni, con contenuto acquoso molto più elevato o con colore differente.
3. Mastite clinica moderata (Grado II): è presente flogosi a livello della mammella, che può presentarsi calda, rigonfia e dolente.
4. Mastite clinica grave (Grado III): la bovina presenta i segni di una patologia sistemica, con possibile inappetenza, ipertermia, riduzione della produzione latte, disidratazione e potenziali segni di endotossemia.

Constable et al. (2016), propongono un sistema più schematico, ma simile a quello di Scott et al. (2011) per la classificazione delle mastiti cliniche ovvero:

- Latte anormale: Grado I
- Mammella anormale: Grado II
- Vacca anormale: Grado III

2.5.2 Classificazioni in base alla forma anatomopatologica

La classificazione anatomopatologica può risultare utile nel caso si debba effettuare una necropsia o si esamini una lesione di una mastite clinica (Zachary, 2017):

- Mastite necrotizzante grave (gangrenosa): è una patologia con forte risentimento sistemico per l'animale infetto, in fase acuta la bovina si presenta anoressica, febbrile, leucopenica e ipocalcemia. A livello dell'organo il quarto colpito si presenta edematoso, duro e dolente, con lesioni necrotiche circondate da un bordo emorragico ed iperemico. Il latte è acquoso o contenente flocculi di fibrina che possono arrivare a ostruire i dotti galattofori. Tale mastite può essere causata dal rilascio di endotossine da parte di batteri Gram negativi oppure da batteri Gram positivi come *S. aureus* capaci di produrre tossine necrotizzanti. La degranolazione massiva dei neutrofili in risposta all'infezione è parte integrante del danno necrotizzante e citopatico. A causa dell'effetto immunosoppressivo ed alla riduzione delle barriere esterne spesso sono presenti

concomitanti infezioni secondarie. In gran parte dei casi il danno all'organo è permanente e conduce alla riforma dell'animale.

- Mastite grave: in questo caso i meccanismi sono identici alla mastite grave necrotizzante ma con minori effetti sistemici e di danno tissutale. In particolare, è assente la necrosi del tessuto mammario, con conseguente minor risentimento dell'animale. Sono comunque presenti edema, dolorabilità e flocculi di fibrina nel latte.
- Mastite purulenta: spesso nominata come “mastite estiva”, questa tipologia di infiammazione è causata da batteri che richiamano una massiva risposta neutrofilica: i detriti necrotici dei granulociti sono causa della lesione purulenta. Questa è localizzata di solito nei dotti e seni galattofori, che si presentano ostruiti dall'essudato purulento. I patogeni più frequentemente coinvolti sono *M. bovis*, *T. pyogenes*, *S. dysgalactiae*.
- Mastite granulomatosa: causata spesso da agenti atipici (*C. neoformans*, *N. asteroides*, Mycoplasmi che non siano *M. bovis*), è una patologia tendenzialmente ad andamento cronico che provoca nell'animale letargia e perdita di peso progressivo, con uno stato febbrile che si può protrarre anche per alcune settimane. La mammella si presenta gonfia, calda e dolente e può presentare multipli granulomi o ascessi. Spesso i granulomi sono circondati da tessuto fibroso, che contribuisce alla perdita di funzionalità della ghiandola. Le lesioni colpiscono spesso i seni e dotti galattofori; nel latte possono essere rilevate delle piccole particelle biancastre.

2.5.3 Classificazioni in base all'agente eziologico

Sono stati identificati più di 140 organismi patogeni che possono causare mastite; basandosi sulle caratteristiche epidemiologiche possono essere divisi nei seguenti gruppi (Constable et al., 2016):

- Microrganismi contagiosi: in questa categoria rientrano microrganismi che sono patogeni obbligati del tessuto mammario e che quindi hanno una scarsa capacità di sopravvivere nell'ambiente esterno o sulla cute della mammella. La più frequente forma di diffusione dei patogeni tra le bovine è di conseguenza la mungitura. I più importanti microrganismi contagiosi sono *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma bovis*. Questi sono spesso causa di mastiti subcliniche molto difficili da debellare e che spesso recidivano e portano alla riforma dell'animale colpito.

- Patogeni opportunisti della cute della mammella: i più comuni sono gli stafilococchi coagulasi negativi (CNS), patogeni che hanno la capacità di infettare la mammella risalendo dalla cute del capezzolo al canale ed al parenchima mammario. Tendenzialmente causano mastiti lievi.
- Patogeni ambientali: questi patogeni sono naturalmente presenti nell'ambiente, quindi l'incidenza di mastiti da ambientali è strettamente collegata al livello di igiene dell'allevamento zootecnico. I microrganismi maggiormente presenti in questa tipologia di mastiti sono i coliformi (*Escherichia coli* e *Klebsiella spp.*) insieme a Streptococchi ambientali (*S. uberis* e *S. dysgalactiae*), a *Trueperella pyogenes* e *Corynebacterium bovis*. Questi agenti eziologici spesso causano mastiti cliniche da lievi a moderate, ma possono anche causare gravi quadri sistemici a seguito del rilascio di endotossine.
- Patogeni non comuni: questa categoria include un gran numero di microrganismi che molto raramente vengono rinvenuti come agenti primari di mastite. Possono essere batteri, funghi, alghe (*Prototheca spp.*) e, ancora più raramente, alcuni virus. La presentazione clinica può essere molto variabile.

2.6 Organismi patogeni

In questo capitolo verranno trattati i principali organismi patogeni che causano mastite e verrà dedicato maggior interesse ai patogeni oggetto di studio della Tesi (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Prototheca spp* e *S. uberis*). *Mycoplasma bovis* era inizialmente incluso nello studio ma non sono stati rilevati allevamenti zootecnici con presenza di questo patogeno. È stato comunque trattato insieme ai principali patogeni.

2.6.1 *Staphylococcus aureus*

S. aureus è un batterio Gram positivo, catalasi positivo e coagulasi positivo riconosciuto a livello mondiale come uno dei più importanti agenti eziologici causanti mastite (Monistero et al., 2018).

La principale fonte e reservoir di questo patogeno è la ghiandola mammaria della bovina in lattazione ma può essere rinvenuto anche su varie superfici, su capezzoli e mammella delle manze, sulle lettiere, nell'alimento, nelle mani e narici degli addetti alla mungitura (Roberson

et al., 1994). Tenzionalmente la trasmissione avviene durante la fase di mungitura tramite il contatto con le mani del mungitore o del gruppo di mungitura contaminato (Constable et al., 2016) ma un'altra possibile trasmissione può avvenire tramite le mosche attraverso ferite sui capezzoli o sulla mammella (Ryman et al., 2013).

L'infezione avviene per via ascendente; una volta penetrato, *S. aureus* ha una serie di fattori di patogenicità che gli consentono di invadere, colonizzare e resistere nel tessuto mammario. I principali fattori, presenti in alcuni ceppi, sono:

- Produzione di biofilm, che facilita l'adesione al tessuto e protegge i batteri da antibiotici e dalla risposta immunitaria (Snel et al., 2014).
- Produzione di coagulasi, che trasforma il fibrinogeno in fibrina (Constable et al., 2016).
- Produzione di tossine α e β che distruggono il tessuto (facilitando la colonizzazione) e riducono la risposta leucocitaria (Piccinini et al., 2010).
- Produzione di leucocidine, che inattivano la risposta neutrofilica (Pérez et al., 2020).

Tuttavia, la maggior preoccupazione in ambito di salute animale e salute pubblica è la possibilità di isolare dei ceppi di *S. aureus* produttori di β -lattamasi e meticillino-resistenti, chiamati MRSA (Köck et al., 2010; Dweba et al., 2018). Infatti, questi batteri, oltre alla resistenza a buona parte degli antibiotici, possono perdere il tropismo ospite specifico e passare dai bovini all'uomo e viceversa (Magro et al., 2018; Monistero et al., 2018). Questo patogeno produce inoltre delle endotossine che si possono accumulare nel latte ed essere causa di tossinfezioni alimentari per l'uomo (Pérez et al., 2020).

Oltre alla forma subclinica, che è la più frequente, possono esserci dei casi di mastite clinica grave, con la necrosi gangrenosa del tessuto e a volte la morte improvvisa dell'animale (Constable et al., 2016).

Il gold standard per la diagnosi di *S. aureus* è l'esame batteriologico che raggiunge una sensibilità del 74,5% se effettuato su prelievo da singolo quarto; se il campione viene ripetuto una seconda e terza volta la sensibilità sale al 94% e al 98% (Sears et al., 1990). La specificità invece è molto alta e si avvicina al 100% (Keefe, 2012).

Per i motivi visti in precedenza, la terapia in lattazione ha scarso successo e anche se l'animale sembra guarito dopo alcuni mesi tende a recidivare. Di conseguenza la terapia in lattazione è sconsigliata (Constable et al., 2016). La terapia in asciutta, se l'infezione non ha cronicizzato, si è dimostrata più efficace nel trattare le infezioni da *S. aureus* (Petersson-Wolfe et al., 2010).

Data la scarsa efficacia delle terapie antibiotiche, il controllo delle mastiti da *S. aureus* deve basarsi soprattutto sull'igiene in sala di mungitura e sull'identificazione, isolamento e riforma delle bovine positive, in modo che l'infezione non possa trasmettersi al resto della mandria (Constable et al., 2016).

2.6.2 *Streptococcus agalactiae*

S. agalactiae è un batterio Gram positivo, catalasi negativo; storicamente considerato un patogeno obbligato della mammella del bovino (Keefe, 1997), recenti studi sembrano contraddire questa affermazione poiché sembra che siano stati rilevati dei ceppi in grado di sopravvivere nell'ambiente (Jørgensen et al., 2016; Cobo-Ángel et al., 2018). Comunque questo patogeno ha tendenzialmente una scarsa resistenza ambientale, di conseguenza è facilmente contenibile con misure di biosicurezza e con un adeguato protocollo di igiene in fase di mungitura (Keefe, 2012; Constable et al., 2016).

L'introduzione di questo patogeno in allevamento avviene solitamente importando bovine infette, anche se è stato dimostrato che è possibile l'introduzione attraverso mungitori che lavorano in altre stalle dove è presente questo patogeno (Mweu et al., 2012).

I principali reservoir di questo patogeno sono la mammella della bovina infetta e le piaghe sulla cute del capezzolo (Keefe, 2012; Constable et al., 2016). La fase di trasmissione del patogeno più importante è quindi la mungitura, attraverso gruppi di mungitura contaminati, mediante le mani del mungitore o tramite i pezzi di stoffa o carta assorbente che vengono utilizzati per pulire i quarti di bovine diverse (Keefe, 1997). L'unica via di penetrazione nella mammella per questo patogeno è attraverso il canale del capezzolo (Keefe, 2012).

Dopo essere penetrato nella mammella, questo patogeno si localizza principalmente nei dotti aderendo alle cellule epiteliali; la produzione latte inizia a decrescere quando i dotti risultano ostruiti dai residui cellulari e quando gli alveoli iniziano a involvere. Per questo, una rapida diagnosi e un trattamento precoce garantiscono la restitutio ad integrum dell'organo (Erskine and Eberhart, 1990).

S. agalactiae causa tipicamente una mastite subclinica con elevata escrezione di SC (Keefe, 2012) e di patogeno. Per questo, la diagnosi attraverso esame batteriologico del latte della singola bovina ha una specificità del 95% e una sensibilità che si avvicina al 100%. Data la natura esclusivamente intramammaria del patogeno, anche la specificità dell'esame colturale del latte di massa si avvicina al 100% (Keefe, 2012).

La terapia antibiotica intramammaria si è dimostrata molto efficace nel controllo di questo patogeno (Edmondson, 2011). Il tasso di guarigione delle infezioni da *S. agalactiae* varia dal 90% al 100% utilizzando somministrazioni intramammarie di penicillina, cefalosporine, eritromicina o cloxacillina (Constable et al., 2016). L'utilizzo della cosiddetta *blitz therapy* (terapia antibiotica intramammaria immediata), insieme ad accurate procedure di disinfezione è risultata la migliore scelta per l'eradicazione e il controllo di questo patogeno in allevamento, rispetto alla terapia antibiotica in asciutta (Edmondson, 2011; Mendonça et al., 2017).

2.6.3 *Mycoplasma bovis*

M. bovis è uno dei patogeni più importanti nell'allevamento bovino, ed è causa di mastiti, arteriti, cheratocongiuntiviti, otiti medie e polmoniti, infatti è tra i patogeni responsabili del *Bovine Respiratory Disease Complex* (Dudek et al., 2020).

L'introduzione di questo patogeno in una mandria avviene tendenzialmente attraverso l'acquisto di animali infetti senza il rispetto delle adeguate norme di biosicurezza (es. quarantena sanitaria). La trasmissione all'interno della mandria avviene principalmente attraverso la contaminazione del gruppo di mungitura oppure delle mani dei mungitori (Aebi et al., 2015). Altre vie di trasmissione sono possibili, come l'eliminazione del patogeno attraverso secrezioni nasali o feci e la contaminazione della mammella, ma la colonizzazione dell'apparato mammario può avvenire anche per via ematogena (Smith, 2015).

Una volta penetrato nella mammella, questo patogeno colonizza frequentemente gli altri quarti e provoca una mastite purulenta ma grazie alla diffusione ematogena può colpire anche altri organi, come articolazioni e polmoni (Constable et al., 2016). L'insorgenza della sintomatologia può essere molto rapida, con l'insorgenza della forma clinica e il drammatico calo della produzione latte, anche da una mungitura all'altra (Smith, 2015; Dudek et al., 2020). Il recupero della funzionalità della mammella è molto difficile; data la difficoltà di trattamento ed i danni permanenti all'organo può essere necessaria la riforma nel 75% delle bovine affette.

Il *gold standard* per la diagnosi di *M. bovis* è l'esame colturale tuttavia questa procedura è lenta e difficoltosa, dato che *M. bovis* risulta difficile da far crescere nel terreno di coltura ed inoltre può essere facilmente contaminato dalla crescita di alcuni batteri che rendono il test non diagnostico (inquinato). Per questo motivo sono in via di sviluppo altri test (es. real-time PCR) che possano essere un'alternativa affidabile all'esame batteriologico (Dudek et al., 2020).

Il trattamento farmacologico di *M. bovis* è solitamente inefficace, sconsigliato e le bovine infette andrebbero considerate tali per tutta la loro vita (Constable et al., 2016; Nicholas et al., 2016). Questo patogeno, data l'assenza di una parete cellulare, è intrinsecamente resistente a penicilline e cefalosporine e gran parte degli isolati degli ultimi anni si dimostrano resistenti alle principali classi di antimicrobici, inclusi i fluorochinoloni (Nicholas et al., 2016). Inoltre, la localizzazione multisistemica rende difficile un'eliminazione totale del patogeno. I Mycoplasmi hanno la capacità di invasione intracellulare e di formare biofilm che permette a questi patogeni di resistere ai trattamenti antibiotici (McAuliffe et al., 2006).

Per tutta questa serie di motivi il controllo di questo patogeno dovrebbe essere effettuato tramite rapida riforma delle bovine infette e l'utilizzo di ottime procedure di igiene e biosicurezza (Punyapornwithaya et al., 2012).

2.6.4 *Prototheca spp*

Il genere *Prototheca* caratterizza dei microrganismi algali privi di clorofilla (Costa et al., 1996; Constable et al., 2016) che, insieme al più raro *Chlorella* sono le uniche piante in grado di provocare malattie infettive nell'uomo e negli animali (Marques et al., 2008). Questi microrganismi sono ubiquitari ma sono presenti soprattutto in ambienti umidi e con alta presenza di materiale organico (Costa et al., 1996; János et al., 2001). Ad oggi solo *P. zopfii* genotipo-2 e *P. blaschkeae*, prima classificata come *P. zopfii* gen-3 (Roesler et al., 2006), sono in grado di dare mastiti cliniche e subcliniche nelle bovine (Cremonesi et al., 2012).

La mastite da *Prototheca* è tendenzialmente asintomatica e cronica, con un elevato conteggio di cellule somatiche anche superiore a 10^6 cell/ml ma in alcuni casi si possono osservare delle forme acute con sintomatologia clinica (János et al., 2001).

Le IMI da *Prototheca* avvengono con maggiore frequenza durante periodi piovosi e caldi e riflettono uno scarso management ambientale e una inadeguata igiene in fase di mungitura, che riveste un ruolo cruciale nella trasmissione del patogeno tra la mandria (Zaini et al., 2012; Constable et al., 2016).

La diagnosi può essere effettuata sia su latte di massa sia da prelievo da singolo quarto: viene effettuata tipicamente con un esame microbiologico (Marques et al., 2008), ma si stanno sviluppando delle tecniche molecolari in capaci di identificare precisamente specie e genotipo in tempi molto più rapidi (Marquez et al., 2008; Cremonesi et al., 2012; Jagielski et al., 2018A).

Data la scarsità di terapie disponibili per questo patogeno (Jagielski et al., 2012; Jagielski et al., 2018B) è fondamentale un accurato management ambientale, una rapida identificazione dell'infezione e un rapido isolamento con riforma delle bovine positive. La disinfezione delle attrezzature per la mungitura è particolarmente importante, data la capacità di *Prototheca* di formare un biofilm che la rende maggiormente resistente agli agenti disinfettanti (Gonçalves et al., 2015). Inoltre, è stato dimostrato che il materiale delle cuccette può influenzare la crescita dell'alga, in particolare il truciolo è più efficace nel rallentare la crescita rispetto alla sabbia, alla segatura o al digestato (Adhikari et al., 2013).

L'identificazione e l'eliminazione di questo patogeno negli allevamenti risulta di cruciale importanza nell'allevamento bovino e in ambito di sicurezza alimentare a causa del suo potenziale zoonotico e della sua possibile resistenza alla pasteurizzazione (Zaini et al., 2012).

2.6.5 *Streptococcus uberis*

S. uberis (insieme a *S. dysgalactiae* e altri streptococchi) viene classificato nel gruppo degli streptococchi ambientali (Smith, 2015). Generalmente la proporzione delle IMI di questi patogeni aumenta nelle stalle in cui *S. aureus* e *S. agalactiae* sono sotto controllo o eradicati (Constable et al., 2016), probabilmente perché le misure di controllo per questi patogeni hanno poca efficacia verso i patogeni ambientali (Tomita et al., 2008).

Gli streptococchi ambientali sono dei patogeni ubiquitari, pertanto il maggior fattore di rischio per contrarre l'infezione è il contatto tra i capezzoli della bovina e aree con una elevata carica di questi batteri. Le zone con molto accumulo fecale e le cuccette in paglia non cambiate regolarmente sono tra le maggiori fonti di contaminazione per la mammella (Leigh, 1999). Nonostante la loro natura principalmente ambientale, sembra che *S. uberis* e *S. dysgalactiae* possano comportarsi come patogeni contagiosi (Lundberg et al., 2014; Davies et al., 2016).

Il principale momento di infezione avviene tra le due settimane prima del parto e le due settimane dopo il parto, probabilmente causate dallo stato immunosoppressivo della gravidanza (Constable et al., 2016). Le IMI da streptococchi ambientali rimangono tendenzialmente subcliniche e comportano un elevato aumento dell'SCC (Djabri et al., 2002) anche se possono evolvere in mastiti cliniche fino al 50% dei casi con solo il 10-20% di bovine con malattia sistemica (Smith, 2015).

La diagnosi viene effettuata nello stesso modo di quella per *S. agalactiae* (Constable et al., 2016).

La risoluzione spontanea della mastite entro i 30 giorni è abbastanza frequente (Smith, 2015). Gli streptococchi ambientali si sono dimostrati sensibili alla penicillina, alla novobiocina, all'amoxicillina, alla cefapirina e oltre il 96% è suscettibile alla tetraciclina (Constable et al., 2016). Il trattamento endomammario si è dimostrato efficace nella gran parte dei casi inoltre trattare gli animali affetti aiuta a ridurre la carica ambientale (Hillerton e Berry, 2003). Il controllo di questi patogeni avviene principalmente attraverso il management ambientale, assicurando cuccette pulite e asciutte agli animali e riducendo la quantità di feci nell'ambiente (Hillerton e Berry, 2003).

2.6.6 Altri patogeni

Corynebacterium bovis

È un agente patogeno contagioso frequentemente associato a mastiti subcliniche con moderato rialzo dell'SCC e scarsi effetti (Gonçalves et al., 2014; Gonçalves et al., 2016). Provoca mastiti cliniche solo in rari casi e l'implementazione di procedure di pre e post dipping sono solitamente sufficienti per il controllo di questo patogeno (Smith, 2015).

Stafilococchi coagulasi-negativi (CNS)

Sono microrganismi patogeni opportunisti che risiedono sulla cute del capezzolo e colonizzano la mammella penetrando per via ascendente (Constable et al., 2016). La loro effettiva importanza nell'ambito delle mastiti è tuttora dibattuta (Schukken et al., 2009; Dufour et al., 2012). Causano tendenzialmente mastiti subcliniche autolimitanti con lieve o moderato rialzo del SCC, specialmente in bovine primipare, e sono facilmente controllabili con misure igieniche di disinfezione della mammella (Pyörälä and Taponen, 2009; Constable et al., 2016).

Coliformi

Le mastiti da batteri coliformi sono causate da microrganismi ambientali emessi con le feci, come *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.* e *Serratia spp.* (Smith, 2015). Le fonti che garantiscono la maggiore crescita dei patogeni sono quelle a substrato organico, soprattutto se

umide e a temperature calde; di conseguenza la maggior parte delle mastiti da coliformi si verifica nei periodi dell'anno in cui è maggiormente presente un clima caldo e umido (Hogan and Larry Smith, 2003). La tipologia di presentazione delle mastiti da coliformi è molto variabile e va da una mastite subclinica a mastiti iperacute con decesso dell'animale (Constable et al., 2016). Il controllo di queste patologie passa attraverso una gestione attenta dell'ambiente con il mantenimento di una lettiera asciutta e pulita (Hogan and Larry Smith, 2003).

Trueperella pyogenes

Questo patogeno è una delle principali cause della cosiddetta “mastite estiva” (chiamata così perché si presenta specialmente nei mesi estivi), una mastite purulenta con risentimento sistemico che spesso porta a dover riformare la bovina (Constable et al., 2016; Ishiyama et al., 2017). È più frequente nelle bovine in asciutta e la trasmissione può avvenire attraverso le mosche o l'esposizione della cute danneggiata all'ambiente (Smith, 2015). La terapia antibiotica è difficilmente risolutiva e il recupero del quarto danneggiato si attesta al 14,6% (Ishiyama et al., 2017). Gli unici metodi per la riduzione di questa patologia sono la riduzione delle mosche, una buona terapia antibiotica in asciutta, igiene ambientale e isolamento delle vacche colpite (Constable et al., 2016).

2.7 Diagnosi

2.7.1 Diagnosi diretta

Esame clinico

Riguardo alla diagnosi di mastite clinica un ruolo fondamentale viene svolto dall'operatore che si occupa della mungitura (Ashraf e Imran, 2018). Infatti, la pratica del pre-dipping, con l'eiezione e l'esame dei primi getti di latte, svolge una funzione fondamentale nel riconoscimento della patologia poiché qualunque alterazione, anche minima, del quarto e/o del latte è sufficiente per la diagnosi di mastite clinica (Lam et al., 2009; Ruegg e Pantoja, 2013). Di conseguenza per diagnosticare le mastiti subcliniche è obbligatorio effettuare degli esami di laboratorio (Constable et al., 2016). Per la diagnosi del patogeno sarà comunque necessario effettuare un esame batteriologico sul quarto infetto.

Esame batteriologico del latte di massa

Questa tipologia di esame può tornare utile in caso di screening di massa per i principali patogeni. Per esempio, presenza di patogeni ambientali può essere correlata non solo alla presenza di mastiti subcliniche causate da questi patogeni, ma anche all'igiene dell'ambiente e alla fase di mungitura (Jayarao et al., 2004).

Per *S. aureus* e *S. agalactiae* la sensibilità di questa procedura è spesso bassa, ma la specificità è molto alta e quindi può risultare efficace in caso di campionamenti ripetuti (Jayarao et al., 2004; Constable et al., 2016).

Esame batteriologico del latte della singola bovina

L'esame colturale del latte di una singola bovina è considerato il gold standard per la diagnosi di mastite subclinica (Martins et al., 2019; Nagasawa et al., 2020). Il microbiologico da pool di quarti è stato usato per molto tempo e per alcuni patogeni, come *S. agalactiae* e *Mycoplasma*, risulta efficace; in caso di *S. aureus* però, il 40% circa dei quarti infetti non viene rilevato in caso di utilizzo del pool di quarti (Lam et al., 2009; Smith, 2015). Inoltre, è ormai preferita la coltura del singolo quarto poiché è necessario individuare il quarto infetto per iniziare un trattamento (Constable et al., 2016). Il trattamento selettivo permette una riduzione dei costi e una riduzione dell'uso dell'antimicrobico rispetto al trattamento alla cieca di tutti i quarti.

Il campionamento dovrà essere effettuato evitando la contaminazione del campione; di conseguenza è fondamentale un'accurata pulizia del capezzolo e una buona disinfezione. Nel caso il campione non dovesse essere consegnato subito al laboratorio di analisi andrebbe o refrigerato o congelato (Smith, 2015; Constable et al., 2016).

Esame colturale in campo

Negli ultimi anni sono stati sviluppati dei test colturali da effettuare direttamente in allevamento, qualora l'allevatore rilevi una mastite clinica. Questi test contengono delle piastre selettive per varie tipologie di batteri (es. Gram negativi, Gram positivi, streptococchi) che permettono di eseguire diagnosi rapida e di partire immediatamente col trattamento antibiotico sulla base della storia clinica della stalla e del patogeno. Nelle stalle dove la coltura in stalla è stata implementata è stato ridotto del 50% l'uso di antibiotici endomammari e ne consegue una

riduzione del latte scartato, senza inficiare su terapia e rischio di reinfezione rispetto alla coltura in laboratorio (Lago et al., 2011).

Altri test diretti

In alcuni casi di mastite clinica l'esame batteriologico risulta negativo. Questo può essere dovuto alla spontanea eliminazione del patogeno da parte della bovina, a una bassa carica batterica nel latte, a una localizzazione intracellulare del patogeno, a una eliminazione intermittente oppure alla presenza di sostanze inibitorie nel latte, per esempio se è già stato iniziato un trattamento antibiotico (Constable et al., 2016).

L'uso di strumenti innovativi come test PCR e real time-PCR può risultare utile per aumentare la velocità e la sensibilità della diagnosi (Smith, 2015). Tuttavia, per evitare falsi positivi i prelievi vanno effettuati mantenendo un'asepsi accurata, che richiede personale specializzato e attrezzato (Mahmmod et al., 2013; Martins et al., 2019). Inoltre, dato che la PCR rileva il DNA sia dei batteri vitali sia di quelli inattivi, la positività per un patogeno non è sufficiente per iniziare un trattamento antibiotico (Smith, 2015).

2.7.2 Diagnosi indiretta

SCC del latte di massa

L'esame delle cellule somatiche (SCC) da campione del latte di massa è un ottimo indicatore della salute della mammella e della qualità del latte nella mandria (Constable et al., 2016; Olechnowicz and Jaśkowski, 2013), inoltre è in correlazione inversa con la produzione di latte (Hagnestam-Nielsen et al., 2009). Bisogna ricordare che in Italia il massimo valore di cellule somatiche per la commercializzazione del latte è 400.000 cellule/ml (direttiva 92/46/CEE) e comunque questo valore influenza la distribuzione dei premi per gli allevatori.

Il numero di cellule somatiche nel latte di massa può dare un'idea approssimativa di quanti quarti siano infetti ed inoltre SCC superiore a 300.000 cell/ml nel latte di massa è un indicatore per l'allevatore al fine di effettuare dei controlli a livello di singola bovina (Constable et al., 2016).

SCC da singoli quarti o da pool di quarti

Il livello di SCC è indicativo della salute della mammella della bovina ed è in correlazione inversa con la produzione di latte (Hagnestam-Nielsen et al., 2009). È possibile valutare il valore di cellule somatiche di una bovina per il singolo quarto oppure da un pool di latte prelevato da tutti e quattro i quarti. La valutazione delle cellule somatiche da pool di quarti viene effettuata insieme all'esame dei dati produttivi della bovina, come grasso e proteine, quindi è più facilmente disponibile agli allevatori.

Constable et al. (2016) mettono in luce come i quarti sani abbiano un valore di cellule somatiche inferiore a 100000 cell/ml e come questo valore debba essere utilizzato come cutoff per indicare la presenza o l'assenza di una IMI a livello di singolo quarto; suggeriscono come soglia indicativa per il pool di quarti il valore di 200000 cell/ml. Petzer et al., (2017) invece, suggeriscono il valore di 200000 cell/ml per il latte da singolo quarto e 150000 per il latte da pool di quarti. Jashari et al., (2016) concludono che per selezionare il valore soglia di SCC da pool di quarti per effettuare un batteriologico sia necessario adattarlo al numero di parti della bovina, allo stadio di lattazione, alla prevalenza di mastiti subcliniche nell'allevamento e al gruppo di patogeni a cui si è interessati.

È presente un sistema di punteggio che divide il conteggio di SCC in dieci punteggi (da 0 a 9), conosciuto come SCS ($\text{somatic cell score} = \log_2(\text{SCC}/100000) + 3$): in questo modo un valore di cellule somatiche di 100000/ml risulta uguale a un SCS di 3. L'utilizzo di questo particolare punteggio risulta particolarmente utile in caso si vogliano utilizzare i comuni strumenti statistici come ad esempio media e mediana (Constable et al., 2016).

Come detto sopra, quando è stato identificato lo stato di malattia del quarto o della mammella, è necessario effettuare esami più specifici per identificare il patogeno al fine di effettuare il protocollo terapeutico più adeguato.

California Mastitis Test (CMT)

Il CMT è uno dei più economici e affidabili test per il rilevamento delle mastiti subcliniche in stalla. Consiste in quattro pozzetti cui deve essere aggiunta pari quantità di latte e reagente. Il reagente tende a lisare il nucleo delle cellule somatiche e a farle gelificare. Una volta aggiunto il latte e il reagente si roteano i pozzetti per circa un minuto. Maggiori sono le cellule somatiche, maggiore è la gelificazione del composto, che può essere classificato in cinque valori: Negativo, Tracce, 1, 2 e 3 (Constable et al., 2016). A seconda che si considerino come cut-off per l'esame

batteriologicalo i valori pari e superiori a 1 o pari e superiori a 2, sensibilità e specificità variano da 68,8% e 71,5% a 55,0% e 86,6% (Dingwell et al., 2003). Dato il basso costo rimane comunque un ottimo test di screening.

Attività NAGasi e LDH

L'NAGasi (N-acetil- β -D-glucosamminidasi) è un enzima intracellulare derivato principalmente dall'epitelio mammario danneggiato ma in minima parte anche dai neutrofili (Kitchen et al., 1978). Questo test risulta particolarmente utile nell'esaminare campioni ripetuti e può essere effettuato e letto lo stesso giorno del prelievo. Tuttavia, è consigliabile congelare e scongelare i campioni di latte a causa della natura intracellulare di questo enzima (Constable et al., 2016).

L'LDH è un enzima citoplasmatico presente in tutte le cellule che è coinvolto nel metabolismo glicolitico; l'attività di questo enzima aumenta nei casi di mastite (Harmon, 1994).

È presente un test da utilizzare in stalla (UdderCheck™) che misura l'attività di entrambi gli enzimi: è rapido ed economico ma ha una sensibilità ridotta rispetto ai test che utilizzano il SCC (Martins et al., 2019).

Conducibilità elettrica

In caso di mastite aumenta nel latte la concentrazione di ioni sodio e cloro, portando quindi all'aumento di conducibilità elettrica nel quarto affetto (Norberg et al., 2004). I vantaggi di questo sistema di misurazione sono la rapidità e la possibilità di innestare gli apparecchi per la misurazione direttamente sul gruppo di mungitura (Constable et al., 2016; Martins et al., 2019). Tuttavia, i valori assoluti di conducibilità elettrica non sono sufficienti a differenziare con efficacia i quarti infetti da quelli sani. Più successo ha avuto la differenza di conducibilità elettrica nel tempo e tra i vari quarti, che non hanno ancora garantito dei solidi modelli di differenziazione tra quarto patologico e fisiologico (Norberg et al., 2004; Paudyal et al., 2020).

Variazioni di microelementi

Alcune variazioni nella secrezione di microelementi nel latte possono essere indicative di IMI:

- Cambiamenti nella secrezione di ioni sodio, potassio e cloro (che influenzano anche la conducibilità elettrica).
- Diminuzione della concentrazione del glucosio nel latte di bovine con mastite subclinica e clinica.
- Diminuzione della concentrazione di lattosio, connessa alla aumentata secrezione di Na, K e Cl: il latte è un liquido isotonico e l'infiammazione conduce all'aumento di questi ioni; il lattosio è il principale agente osmotico nel latte, di conseguenza diminuisce (Constable et al., 2016).
- Aumento nella concentrazione di proteina SAA (siero amiloide A) e aptoglobina nel latte nel caso di mastiti subcliniche (Constable et al., 2016; Martins et al., 2019).

2.8 Prevenzione e terapia

Tra gli anni '50 e '90 i medici veterinari hanno trattato la mastite clinica e subclinica con un'enorme varietà di prodotti antibiotici, sia localmente sia per via sistemica sia per entrambe le vie. L'efficacia del trattamento veniva valutata in base alla risposta clinica: se l'animale rispondeva bene il trattamento veniva considerato efficace (Constable et al., 2016). Dai primi anni '90 in poi è stata posta molta enfasi sul fenomeno dell'antibiotico resistenza e dei potenziali residui di antibiotici nel latte, quindi molta più attenzione è stata posta sull'utilizzo scientifico razionale degli antibiotici e sullo sviluppo di metodologie alternative in ottica One Health (Constable et al., 2016; Garcia et al., 2019).

È fondamentale inoltre, definire la differenza tra guarigione clinica e guarigione batteriologica: la guarigione clinica avviene quando il latte ritorna normale, la guarigione batteriologica avviene quando si ha l'impossibilità di isolare il patogeno dai 14 ai 28 giorni dopo l'inizio del trattamento (Constable et al., 2016).

Già nel 1970 il National Mastitis Council aveva pubblicato una serie di cinque punti come linea guida per il controllo delle mastiti (Smith, 2015; Hillerton and Booth, 2018). L'implementazione di queste misure igieniche è fondamentale per il management dei patogeni contagiosi (Neave et al., 1969). I cinque punti verranno trattati durante questo capitolo e sono i seguenti:

1. Utilizzo del post dipping

2. Uso coscienzioso della terapia antibiotica a termine della lattazione
3. Terapia appropriata dei casi clinici
4. Manutenzione e utilizzo accurato dell'apparecchiatura per la mungitura
5. Eliminazione delle bovine infette cronicamente

Data la vastità dell'argomento, in questo capitolo verrà trattata esclusivamente la parte relativa alla prevenzione e terapia dei microrganismi contagiosi oggetto di indagine della Tesi.

2.8.1 Prevenzione

Biosicurezza

In primo luogo, è necessario evitare il più possibile l'introduzione dei microrganismi contagiosi tramite l'implementazione di stringenti misure di sicurezza e di un controllo accurato dei nuovi ingressi nella mandria. Anche se i patogeni sono già presenti nella mandria questi protocolli risultano fondamentali per evitare l'introduzione di nuovi ceppi del patogeno (Barkema et al., 2009).

Igiene in fase di mungitura

La trasmissione dei microrganismi patogeni avviene soprattutto durante la fase di mungitura, è quindi molto importante seguire un protocollo che miri alla massima igiene durante questa procedura (Fox and Gay, 1993).

L'addetto alla mungitura deve indossare guanti puliti, che limitano notevolmente la trasmissione di patogeni tra le bovine durante la mungitura (Dufour et al., 2012). Poi viene effettuato il pre dipping, che consiste nell'applicazione di un disinfettante per ogni capezzolo e la successiva pulizia e asciugatura con della carta assorbente, avendo cura di usare il materiale di asciugatura per una vacca soltanto (Petersson-Wolfe et al., 2010). Il principale obiettivo di questa procedura è abbattere la carica microbica del capezzolo e soprattutto della punta del capezzolo (Pankey, 1989; Ruegg, 2017). Dopo questa procedura avviene l'eiezione dei primi getti di latte che permette di:

1. Valutare alterazioni del latte e quindi la presenza di mastiti cliniche
2. Eliminare i patogeni eventualmente presenti all'interno del tappo cheratinico del capezzolo

3. Stimolare il rilascio dell'ossitocina e quindi limitare i danni dovuti a un aggancio precoce del gruppo di mungitura (Dufour et al., 2012)

Dopo la mungitura viene effettuato il post dipping, l'applicazione di un disinfettante (solitamente a base di iodio o di clorexidina) che viene associato alla glicerina (o comunque una sostanza oleosa) in modo che formi una barriera che protegga il capezzolo aspettandone la fisiologica chiusura (Constable et al., 2016). La procedura di post dipping dovrebbe coprire tutto il capezzolo o almeno la metà inferiore ed è in assoluto la pratica più efficace per il controllo delle mastiti. Se correttamente applicato il post dipping riduce l'insorgenza di infezioni mammarie dal 50% al 90% (Williamson and Lacy-Hulbert, 2013).

Le bovine infette dovrebbero essere munte per ultime, tenute separate dalla mandria (Petersson-Wolfe et al., 2010) ed i gruppi di mungitura disinfettati alla fine della mungitura, poiché possono essere veicolo di trasmissione dei patogeni (Spencer, 1989).

Manutenzione del gruppo di mungitura

L'integrità della cute del capezzolo e dell'orifizio del capezzolo è di fondamentale importanza nella prevenzione delle mastiti. Seppure negli anni siano diminuite le IMI dovute a un difetto dell'impianto di mungitura (Ruegg, 2017) rimane fondamentale effettuare una manutenzione periodica e un corretto aggancio della bovina al gruppo di mungitura, controllando che non ci siano aspirazioni di aria e che la pressione sia adeguata (Dufour et al., 2012; Hillerton e Booth, 2018).

Alimentazione

La somministrazione di vitamina E e selenio nel periparto riduce l'incidenza di mastiti (Smith et al., 1997). Questi microelementi sono parte del sistema antiossidante della cellula: una loro carenza, frequente nel periodo del parto, riduce l'attività dei neutrofili e quindi la resistenza della bovina alle mastiti (Smith et al., 1997; Pyörälä, 2002).

Vaccinazione

I vaccini per i vari agenti patogeni delle mastiti sono in via di ricerca e sviluppo da molto tempo, ma questa patologia si è mostrata molto difficile da affrontare con questo strumento (Ruegg,

2017). Nonostante i risultati ottenuti siano buoni, questo strumento non è abbastanza efficace o economicamente vantaggioso da essere utilizzato da solo (Ismail, 2017). È quindi necessaria una associazione di vaccino, procedure di biosicurezza, terapia mirata e riforma delle bovine croniche per garantire una decisa riduzione di frequenza e durata delle infezioni mammarie.

2.8.2 Terapia antibiotica

Al fine di valutare qual è la terapia ottimale, può essere utile seguire le seguenti domande:

Trattare o non trattare?

La scelta se trattare o meno l'animale si dovrebbe basare sui seguenti punti (Royster e Wagner, 2015; Constable et al., 2016):

1. Classificazione della tipologia di mastite in clinica (lieve, moderata o grave) o subclinica: è necessario valutare la risposta dell'animale all'infezione per decidere se attuare una terapia antibiotica sistemica o locale, aggiungere una terapia di supporto o addirittura nessuna terapia.
2. Tipologia di patogeno coinvolto: isolare il patogeno coinvolto è fondamentale perché ci sono delle grosse differenze nell'esito della terapia a seconda del patogeno; la terapia antibiotica endomammaria per *S. agalactiae* può avere un successo del 90,4% (Reyes et al., 2015) mentre quella per *S. aureus* varia dal 60% per gli animali più giovani fino al 5% per animali anziani con infezioni croniche (Barkema et al., 2006).
3. Età e numero di parti della bovina: la probabilità di guarigione è maggiore nelle bovine primipare e giovani (Pinzón-Sánchez et al., 2011)
4. Quarti coinvolti e gravità della risposta infiammatoria: a seconda del numero di quarti coinvolti e della gravità delle lesioni la bovina potrebbe non essere più ottenibile una restitutio ad integrum dell'organo, con conseguente riforma della bovina.
5. Stadio di lattazione: trattare una mastite, anche con altre probabilità di cura, durante la tarda lattazione potrebbe essere economicamente svantaggioso.
6. Durata dell'infezione: nelle mastiti croniche da *S. aureus*, il patogeno acquisisce la capacità di penetrare i leucociti e sopravvivere come patogeno intracellulare (Hébert et al., 2000), diventando molto complesso da eliminare (Wang et al., 2019). Di

conseguenza, se una mastite da *S. aureus* non venisse diagnosticata in fretta potrebbe non essere efficace e sensato trattare l'animale (Constable et al., 2016).

Per quale via utilizzare l'antibiotico?

La via di somministrazione dell'antibiotico deve essere strettamente legata alla localizzazione del patogeno. Erskine et al., (2003) propongono una classificazione schematica che permette di individuare quali sia la migliore modalità di trattamento a seconda del patogeno (Fig. 2).

Summary of three-compartment model to target mastitis pathogens

Mastitis pathogens	Pharmacologic compartment		
	Milk and ducts	Parenchyma	Cow
<i>Streptococcus agalactiae</i>	+++	—	—
Streptococcal sp	+++	+	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+++	—
Staphylococcal sp	+++	—	—
Coliforms ^a	+	—	+++
Mycoplasma, other gram-negatives ^a	—	—	+++

^a Severe clinical mastitis, supportive care, and prevention of secondary bacteremia are primary concerns.

+++ , primary target; + , some benefit; — , of little value.

Figura 2: Indicazioni sulla localizzazione dei principali agenti di mastite. Da Erskine et al., 2003.

Quale antibiotico usare?

La scelta di antibiotico generalmente si basava sul costo, sulla disponibilità di questo sul mercato, sulla facilità di reperimento e sulla efficacia che aveva dimostrato nei precedenti trattamenti (Constable et al., 2016). Successivamente verranno trattate quali sono le migliori procedure volte a un uso responsabile dell'antibiotico per evitare la riduzione di insorgenza di antimicrobico resistenza.

Per quanto deve essere utilizzato il farmaco?

Nonostante alcuni studi abbiano dimostrato l'efficacia di trattamenti antibiotici prolungati (Truchetti et al., 2014), l'uso prolungato rispetto a quanto dichiarato nel riassunto delle caratteristiche del prodotto rientra nel caso di uso improprio (art.1 Dlgs 193/2006). Le indicazioni cogenti del Ministero della Salute (21 Gennaio 2019) vietano l'uso improprio per

quanto riguarda gli antimicrobici, dunque la durata della terapia deve essere quella indicata nel foglietto illustrativo del farmaco.

Uso prudente degli antimicrobici e AMR

L'antimicrobico resistenza (AMR) è una grave minaccia alla salute globale sia per l'uomo sia per gli animali (Chambers et al., 2020); l'Organizzazione Mondiale della Sanità l'ha definita uno delle 10 maggiori minacce alla salute pubblica (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). L'AMR è un processo antichissimo ed è una semplice conseguenza del processo di evoluzione e adattamento all'ambiente dei microrganismi (Perry et al., 2016). Tuttavia, a causa dell'elevata pressione selettiva dovuta a un uso eccessivo degli antimicrobici questo processo negli ultimi anni ha assunto sempre maggior rilevanza (Palma et al., 2020). I principali meccanismi di AMR si basano sull'impermeabilità della cellula alle molecole antibiotiche, sulla produzione di enzimi che possano distruggere i farmaci o sulla mutazione dei siti bersaglio degli antibatterici. Inoltre, i meccanismi di resistenza batterica possono essere facilmente trasmessi per via orizzontale tramite plasmidi, trasposoni ed integroni (Sultan et al., 2018). La principale causa dell'aumento di questo fenomeno è stata riconosciuta nell'utilizzo eccessivo o scorretto degli antimicrobici, sia nell'uomo, sia negli animali, sia nell'ambiente (Holmes et al., 2016)

Per questi motivi verso questa minaccia è necessario un approccio One Health, definito come “Lo sforzo collaborativo di più professioni nell'ambito delle *health science* per ottenere uno stato di salute ottimale per le persone, gli animali domestici, la fauna selvatica, le piante e l'ambiente” (McEwen and Collignon, 2018).

L'Unione Europea si sta muovendo da anni verso questa direzione: già nel 2006 sono stati banditi i promotori di crescita, che hanno un effetto positivo sull'aumento di peso degli animali a cui venivano somministrati ma non hanno la capacità di eliminare i patogeni in modo irreversibile (Economou and Gousia, 2015). La Commissione Europea (EC) ha chiesto nel 2013 e nel 2017 all'EMA (European Medical Agency) un parere scientifico mirato allo sviluppo di una classificazione degli antibiotici in base alla loro importanza per l'uso umano. I livelli di classificazione sono i seguenti (Classificazione EMA, 12 Dicembre 2019):

- A. Avoid: sono presenti antibiotici il cui loro uso è permesso in medicina umana e non in medicina veterinaria.

- B. Restrict: sono presenti antibiotici che andrebbero utilizzati in medicina veterinaria solo nel caso non sia presente nessun antibiotico efficace nelle categorie inferiori. L'uso dovrebbe essere effettuato solo sulla base di un antibiogramma.
- C. Caution: questi antibiotici andrebbero utilizzati solo nel caso non ci siano antibiotici nella categoria D efficaci per quella patologia.
- D. Prudence: non ci sono particolari fattori di rischio per la selezione di AMR nell'utilizzo di questi principi attivi. È comunque raccomandato un uso responsabile di questi farmaci, evitando l'uso prolungato e non necessario.

La classificazione degli antibiotici in classi è riportata nella Fig 3

AMEG Categories	Antibiotic class, subclasses	Example of antibiotic(s)
Category A ("Avoid")	Amdinopenicillins	mecillinam, pivmecillinam
	Carbapenems	meropenem, doripenem
	Other cephalosporins ⁵ and penems (ATC code J01D1), including combinations of 3rd-generation cephalosporins with beta-lactamase inhibitors	ceftobiprole, ceftaroline, ceftolozane-tazobactam, faropenem
	Glycopeptides	vancomycin
	Glycylcyclines	tigecycline
	Ketolides	telithromycin
	Lipopeptides	daptomycin
	Monobactams	aztreonam
	Oxazolidinones	linezolid
	Penicillins: carboxypenicillins and ureidopenicillins, including combinations with beta-lactamase inhibitors	piperacillin-tazobactam
	Phosphonic acid derivatives	fosfomycin
	Pseudomonic acids	mupirocin
	Rifamycins (except rifaximin)	rifampicin
	Riminoenazines	clofazimine
	Streptogramins	pristinamycin, virginiamycin
	Sulfones	dapsone
	Drugs used solely to treat tuberculosis or other mycobacterial diseases	isoniazid, ethambutol, pyrazinamide, ethionamide
	Substances newly authorised in human medicine following publication of the AMEG categorisation.	To be determined.
Category B ("Restrict")	Cephalosporins: 3rd- and 4th-generation, except combinations with beta-lactamase inhibitors	ceftiofur, cefovecin, cefquinome
	Polymyxins	colistin, polymyxin B
	Quinolones: fluoroquinolones and other quinolones	enrofloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, oxolinic acid
Category C ("Caution")	Aminoglycosides (except spectinomycin)	streptomycin, gentamicin
	Aminopenicillins in combination with beta-lactamase inhibitors	amoxicillin-clavulanic acid
	Amphenicols	florfenicol, thiamphenicol
	Cephalosporins: 1st- and 2nd-generation, and cephamycins	cefalexin, cefapirin
	Macrolides (not including ketolides)	tylosin, tulathromycin
	Lincosamides	clindamycin, lincomycin
	Pleuromutilins	tiamulin, valnemulin
Category D ("Prudence")	Rifamycins: rifaximin only	rifaximin
	Aminopenicillins, without beta-lactamase inhibitors	amoxicillin, ampicillin
	Cyclic polypeptides	bacitracin
	Nitrofurantoin derivatives*	furazolidone
	Nitroimidazoles*	metronidazole
	Penicillins: Anti-staphylococcal penicillins (beta-lactamase-resistant penicillins)	cloxacillin
	Penicillins: Natural, narrow spectrum penicillins (beta-lactamase-sensitive penicillins)	benzylpenicillin, phenoxymethylpenicillin
	Aminoglycosides: spectinomycin only	spectinomycin
	Steroid antibacterials*	fusidic acid
	Sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and combinations	sulfadiazine, trimethoprim
	Tetracyclines	oxytetracycline, doxycycline

Figura 3: Classificazione degli antibiotici per classi di rischio. (Classificazione EMA, 12 Dicembre 2019)

Oltre a queste quattro categorie, il report dell'EMA aggiunge una scala di vie di somministrazione da utilizzare, dalla più preferibile alla meno preferibile:

1. Trattamento individuale locale (es. iniezioni intrammarie).
2. Trattamento individuale parenterale.
3. Trattamento individuale orale.

4. Medicazioni iniettabili di gruppo (metafilassi) solo se giustificate.
5. Medicazioni orali di gruppo tramite acqua o sostituti del latte solo se giustificate.
6. Medicazioni orali di gruppo tramite mangime solo se giustificate.

Ulteriori linee guida a disposizione del medico veterinario sono state stilate dal Ministero della Salute (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2782_allegato.pdf).

L'insieme di queste linee guida ha consentito alla regione Emilia-Romagna delle proprie linee guida applicative che offrono delle indicazioni precise all'allevatore e al veterinario (Linee Guida Emilia Romagna, 2018).

L'Italia risulta il secondo paese nell'Unione Europea, dopo Cipro, come consumo di antibiotici/PCU (Population Correction Unity) con 244 mg/PCU (Decimo report ESVAC, 21 Ottobre 2020). Tuttavia, grazie alle limitazioni e linee guida introdotte, il trend dal 2010 al 2018 risulta in continua e costante decrescita (Fig. 4).

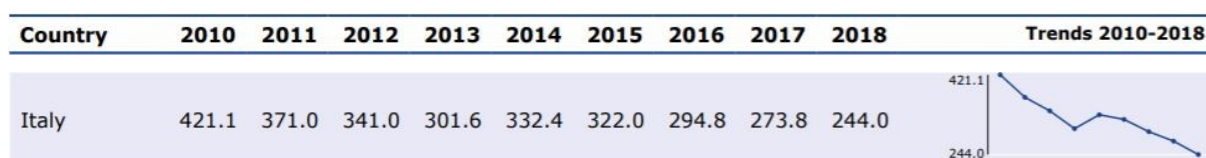


Figura 4: Vendite di antimicrobici in mg/PCU dal 2010 al 2018. Dal Decimo report ESVAC, 21 Ottobre 2020.

Alla luce delle informazioni appena riportate è opportuno esaminare quali sono i protocolli terapeutici che si dovrebbero utilizzare per la terapia delle varie tipologie di mastite.

• Terapia in asciutta

La terapia in asciutta è uno dei capisaldi della gestione dei patogeni contagiosi, specialmente Gram positivi. Consiste nell'applicazione di antibiotico intramammario e alla successiva messa in asciutta della bovina, con o meno l'applicazione di un sigillante per il capezzolo. Esistono due possibili opzioni per questa terapia (Constable et al, 2016):

1. *Blanket therapy*: consiste nel trattare tutti i quarti delle bovine che devono essere messe in asciutta.
2. *Selective therapy*: vengono trattati solo i quarti che presentano un numero elevato di cellule somatiche (>200000, Linee Guida ER, 2018).

Nonostante Constable et al., (2016) consigli la *blanket therapy*, diversi autori non hanno trovato differenze di incidenza di mastiti e di produttività delle bovine tra le due tipologie

di terapia (Cameron et al., 2015; Winder et al., 2019). Inoltre, è stato dimostrato che la terapia selettiva delle bovine può ridurre il consumo di antibiotico del 60% (Vasquez et al., 2018). Di conseguenza, per diminuire l'utilizzo di antimicrobici, la terapia selettiva è da preferire (Linee Guida Emilia Romagna, 2018).

- **Terapia delle mastiti subcliniche durante la lattazione**

Non sempre è vantaggioso trattare le mastiti subcliniche in lattazione poiché molto dipende dal patogeno coinvolto (Sandgren et al., 2008). Per questo è necessario impostare una terapia solo dopo un esame microbiologico (Linee Guida Emilia Romagna, 2018). *S. agalactiae*, per esempio, risponde molto bene alla terapia intramammaria e quindi è conveniente trattarlo (Edmondson, 2011) mentre terapie contro patogeni come *M. bovis* o *Prototheca spp.* hanno scarso successo e quindi è più conveniente la riforma dell'animale (Constable et al., 2016).

- **Terapia delle mastiti cliniche:**

Riconosciamo due casi possibili (Roberson, 2012):

1. Il patogeno che sta causando la mastite è noto: a seconda del patogeno coinvolto è necessario valutare quale trattamento antibiotico è più appropriato e se è appropriato effettuarlo. A seconda della risposta dell'animale è possibile effettuare dei trattamenti di supporto.
2. Il patogeno non è noto: per impostare una terapia è necessario effettuare un esame batteriologico. Se la situazione clinica è lieve o moderata si possono attendere i risultati dell'esame colturale. Se la situazione clinica risulta grave è possibile iniziare una terapia ad ampio spettro e poi aggiustare l'antimicrobico una volta arrivati i risultati (de-escalation).

Uno schema riassuntivo per la valutazione delle mastiti cliniche è presentato nella fig. 5.

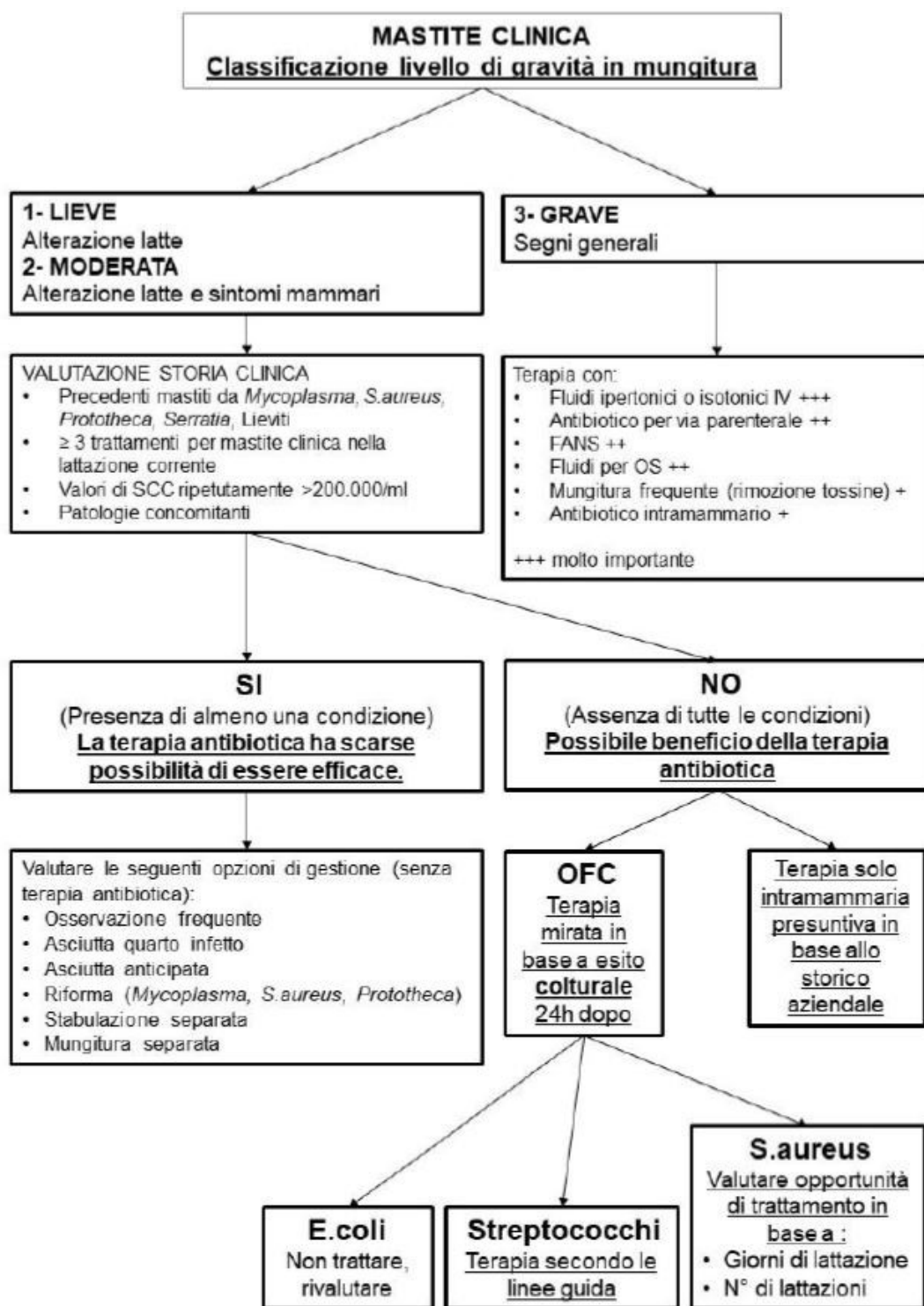


Figura 5: Schema di intervento per la terapia della mastite secondo i principi dell'uso responsabile del farmaco, inclusa la diagnostica in allevamento (OFC: On Farm Culture). Da Linee Guida Emilia Romagna, 2018.

2.8.3 Terapia di supporto

Durante gli episodi di mastite clinica con risentimento sistemico è necessario trattare il dolore e l'infiammazione derivante dalla mastite, sia per dovere deontologico, sia perché il trattamento antinfiammatorio associato alla terapia antibiotica migliora il recupero delle bovine affette (McDougall et al., 2009; Leslie and Petersson-Wolfe, 2012). Tendenzialmente l'uso dei FANS (Farmaci Antinfiammatori Non Steroidei) dà risultati migliori rispetto ai corticosteroidi nel caso di mastite clinica.

Al trattamento antinfiammatorio può essere associata, se la bovina risulta disidratata, una fluidoterapia con cristalloidi isotonici o soluzione salina ipertonica con acqua da bere a disposizione (Constable et al., 2016). La somministrazione di ossitocina e mungiture frequenti aiutano la rimozione dei farmaci e dei patogeni dalla mammella e di conseguenza dovrebbero essere effettuate con frequenza (Smith, 2015).

L'infusione intramammaria di ozono in associazione con la terapia antibiotica si è dimostrata una valida alternativa per il trattamento delle mastiti cliniche (Enginler et al., 2015).

3. Obbiettivi dello studio

I dati inseriti nella presente Tesi appartengono a un progetto di ricerca molto ampio dal titolo LATSAN “Strumenti innovativi nello studio e gestione dello stato sanitario della mammella e del benessere animale finalizzati al miglioramento della qualità nutrizionale e dell’attitudine casearia del latte”. LATSAN comprende analisi di metabolomica, di genomica e di trascrittomica alla base delle infiammazioni intramammarie, valutazione della qualità del latte (in particolar modo il profilo proteico) e della attitudine alla caseificazione in modo da identificare nuovi fenotipi da applicare ai programmi di miglioramento genetico per migliorare la resistenza degli animali alla mastite e dunque ridurre l’uso di antibiotici e l’insorgenza di meccanismi di antimicrobico resistenza.

Per massimizzare i risultati è necessario affrontare questo tema con un approccio multidisciplinare: dunque, alle analisi ematiche e della qualità latte sono stati aggiunti studi di prevalenza e di antimicrobico resistenza dei vari patogeni contagiosi presenti negli allevamenti intensivi di bovine da latte site nella regione Veneto.

Il progetto di questa Tesi ha come obiettivo la valutazione di prevalenza dei principali patogeni contagiosi e la valutazione di eventuale insorgenza di antimicrobico resistenza, al fine di fornire degli strumenti innovativi per l’approccio terapeutico alle mastiti. Di conseguenza saranno approfonditi solo i materiali e metodi inerenti al progetto di Tesi.

4. Materiali e metodi

La presente Tesi di laurea rientrando nel progetto di ricerca “LATSAN” è stata autorizzata dal Ministero della Salute in data 02/04/2020 con Aut. N. 255/2020-PR in risposta alla richiesta 7D5FE.13.

4.1. Selezione delle aziende in funzione dell'agente eziologico di mastite

Per il raggiungimento dell'obiettivo ad oggi sono state selezionate tre aziende site nel territorio della Regione Veneto. La selezione degli allevamenti di bovine, ad elevata produzione latte di razza Frisone Italiana, è avvenuta sulla base degli studi epidemiologici di agenti eziologici causanti mastiti. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVE) ha permesso di individuare aziende con elevata incidenza di mastite ad origine contagiosa nello specifico gli agenti eziologici ricercati nelle aziende agricole del territorio sono stati: i) *Staphylococcus aureus*, ii) *Prototheca spp.*, iii) *Mycoplasma bovis* e iv) *Streptococcus agalactiae*. Il *M. bovis* non è stato evidenziato nei campioni di latte conferiti all'IZSVE per cui non è stata selezionata alcuna azienda agricola del territorio per la presenza di tale agente eziologico causante mastite. In aggiunta ai microrganismi patogeni sopra citati, abbiamo deciso di aggiungere come oggetto di ricerca anche lo *Streptococcus uberis* essendo il principale patogeno ambientale associato a mastite clinica e subclinica. Mediante il servizio diagnostico dell'IZSVE è stata valutata nuovamente la prevalenza degli agenti patogeni nelle aziende oggetto di ricerca. Il 20% delle bovine in lattazione sono state campionate per effettuare una diagnosi eziologica delle infezioni intramammarie (IMI) tramite esame microbiologico del secreto ghiandolare mammario. Al termine di tale procedura abbiamo selezionato le aziende presentanti un numero elevato di positività all'esame batteriologico al fine di selezionare aziende zootecniche con presenza di agenti eziologici di nostro interesse.

4.2. Aziende ed Animali

Sono state selezionate tre aziende rappresentative della realtà produttiva veneta.

La prima azienda, denominata **Azienda A**, sita nel territorio della provincia di Vicenza, è costituita da 144 bovine in lattazione di razza Frisona Italiana. I capi sono allevati a stabulazione libera e le bovine in lattazione sono suddivise in due gruppi, rispettivamente animali con elevata produzione latte e bovine con un numero maggiore a 150 giorni di lattazione e quindi con una produzione latte inferiore rispetto al precedente gruppo. La gestione aziendale prevedeva un periodo di asciutta pari a due mesi.

La seconda azienda, denominata **Azienda B**, sita nel territorio della provincia di Verona, è costituita da 716 animali in lattazione di razza Frisona Italiana. Le bovine sono suddivise in 8 box differenti, in particolare vi è un gruppo di circa 160 bovine caratterizzate in anamnesi da mastiti cliniche e mastiti recidivanti.

La terza azienda, denominata **Azienda C**, sita nel territorio della provincia di Vicenza, è costituita da circa 140 bovine in lattazione di razza Frisona italiana e di razza Bruna alpina. Il progetto LATSAN prevede il campionamento unicamente delle bovine di razza Frisona italiana e per tale motivo sono stati campionati unicamente 84 animali. La suddivisione degli animali, anche in questa azienda, è in funzione ai giorni di lattazione ed alla produttività.

Tutte e tre le aziende prevedevano un sistema di alimentazione mediante unifeed e disponibilità di acqua potabile ad libitum.

Ad oggi, sono state oggetto di campionamento del progetto LATSAN circa mille bovine di razza Frisona Italiana. Gli animali sottoposti a trattamento farmacologico al momento dell'inizio del protocollo sperimentale sono stati esclusi dal progetto di ricerca; se invece sono stati trattati durante i successivi campionamenti sono comunque rientrati nello studio ed è stato valutato il tasso di guarigione.

4.3. Disegno sperimentale

In ciascun allevamento, è stato effettuato un primo campionamento (Time 0-**T0**) due settimane prima del controllo funzionale svolto dall'ARA cui è seguito un secondo campionamento (Time 1-**T1**) in coincidenza del controllo funzionale dove sono stati prelevati esclusivamente i soggetti risultati positivi all'esame batteriologico eseguito al T0. A distanza di un mese da Time 1 è stato effettuato un terzo campionamento (Time 2-**T2**) dove sono stati nuovamente campionati gli animali oggetto di controllo al T1 (Fig. 6).

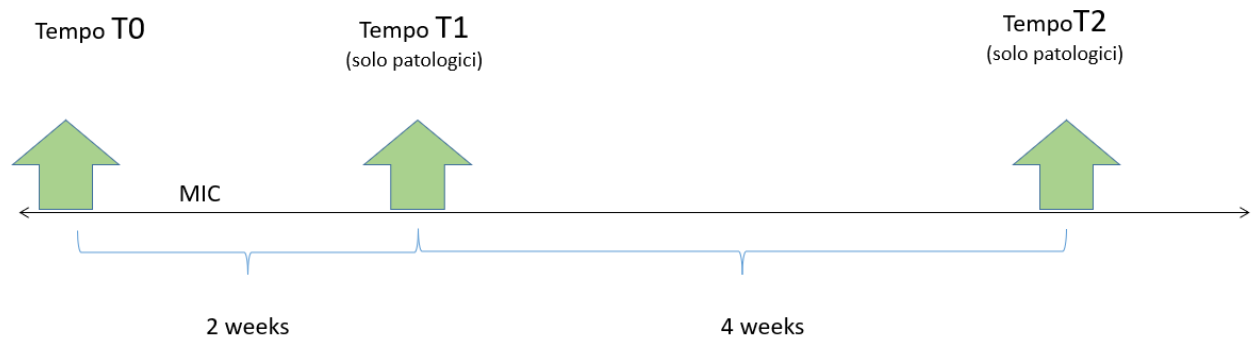


Figura 6: Rappresentazione schematica dei tre tempi di campionamento del progetto LATSAN.

Gli animali sono stati suddivisi, in base ai risultati dei primi due campionamenti, nelle seguenti categorie:

1. Sani: soggetti che al primo prelievo hanno presentato un SCC basso (<200.000 cellule/ml) su pool dei quarti e batteriologico negativo per entrambi i campionamenti.
2. Infetti: soggetti con SCC elevato (>200.000 cellule/ml) su pool dei quarti ed esame batteriologico positivo.
3. Latenti: Vacche con conta cellulare bassa (<200.000 cellule/ml) ed esame batteriologico positivo ad almeno uno dei due campionamenti.
4. Intermittenti: soggetti con conta cellulare elevata (>200.000 cellule/ml) e negativi al batteriologico.

Sulla base dei risultati del terzo campionamento e tenendo conto della precedente assegnazione gli animali infetti o latenti sono stati ulteriormente suddivisi nelle seguenti categorie:

- 1) Cronici: soggetti precedentemente classificati come infetti o latenti con batteriologico positivo al terzo prelievo.
- 2) Guariti: soggetti classificati infetti in uno dei campionamenti precedenti e con cellule basse e batteriologico negativo al terzo prelievo.

1) T0: campionamento in pool di quarti

Campioni sterili di latte provenienti da pool di quarti sono stati effettuati per ogni bovina presente nell'allevamento oggetto di studio. Nell'azienda B, per rilevare la presenza di *S. uberis*, sono stati effettuati campioni dal singolo quarto già in T0.

I campioni sono stati prelevati successivamente alla pulizia manuale dei capezzoli, al pre dipping, all'asciugatura manuale con garze sterili ed a successiva eliminazione dei primi getti di latte. L'operatore al fine di effettuare il campione sterile indossava guanti monouso. Sono

stati campionati 40 mL di latte in Falcon sterili (50 mL, Vetrotecnica S.r.l., Padova, Italy). Mediante la collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) è stato eseguito l'esame batteriologico su tutti i campioni di latte e successiva valutazione della minima concentrazione inibente (MIC) per i campioni risultati positivi a differenti agenti eziologici.

2) T1: campionamento per singolo quarto delle bovine risultate positive a T0

A seguito dei risultati dell'esame batteriologico sono state selezionate le bovine risultate positive a T0. Sono stati prelevati mediante mungitura manuale 50 mL di latte per singolo quarto per l'esecuzione dell'esame batteriologico e della MIC.

3) T2 campionamento per singolo quarto delle bovine risultate positive a T0

Nuovamente sono state campionate le bovine selezionate per il T1 e quindi gli animali risultati positivi all'esame batteriologico eseguito al T0. Il protocollo prevede di ripetere le stesse procedure ed analisi eseguite al T1.

Lo studio non ha incluso interventi diretti sulla mammella se non prelievi di latte da lattometri e prelievi mediante mungitura manuale con pulizia e disinfezione del capezzolo. Il protocollo non ha incluso l'induzione di mastite negli animali oggetto di ricerca; infatti, sono state oggetto di studio unicamente bovine con mastiti insorte spontaneamente. I trattamenti antibiotici per le mastiti sono stati prescritti dal veterinario aziendale in funzione della gravità e dell'agente eziologico. Tutti i trattamenti, eseguiti nell'arco temporale della sperimentazione, sono stati riportati nel dataset del progetto LATSAN.

Oltre ai campionamenti sono stati somministrati agli allevatori dei questionari per inquadrare la situazione aziendale in toto, indagando in particolare tipo di stabulazione, modalità di mungitura, modalità di distribuzione degli alimenti, caratteristiche compositive delle razioni, trattamenti terapeutici eseguiti.

4.4 Coltura batterica

L'analisi colturale dei campioni è stata effettuata dall'IZSVe secondo il protocollo PDP DIA 011.

Sono stati ricercati i principali microrganismi contagiosi (*S. aureus*, *S. agalactiae*, *Prototheca spp.*) e *S. uberis*.

I campioni se refrigerati o congelati sono stati portati a temperatura ambiente, poi sono stati agitati ed è stato prelevato 0,01 mL di latte. Questo è stato seminato in delle piastre agar sangue esculina (ASE) che sono state incubate in termostato a 37°C per 16-24 ore. Dopo questo tempo, è stata effettuata una prima lettura dei campioni, successivamente le piastre sono state lasciate a temperatura ambiente per altre 16-24 ore ed è stata effettuata una seconda lettura.

- Identificazione di *Staphylococcus* coagulasi positivi (SC +):

Le colonie si presentano larghe 3-5 mm di diametro, opache, colore biancastro o giallastro, solitamente emolitiche. Questi microrganismi sono cocchi Gram + (a grappolo), catalasi positiva e KOH negativi.

Il test di conferma è il test di coagulasi.

- Identificazione di *Streptococcus agalactiae*:

Le colonie sono piccole, lisce, traslucide. *Streptococcus agalactiae* può essere non emolitico oppure presentare emolisi di tipo β . Questo microrganismo è Gram + (cocchi a catena), catalasi negativo, KOH negativo, esculina negativo alla lampada di Wood. Esistono due test di conferma: CAMP test e sieroaagglutinazione.

- Identificazione di *Streptococcus uberis* ed *Enterococcus spp*:

Le colonie di entrambi i generi sono piccole, lisce e opache. Sono cocchi a catena Gram +, catalasi negativi e KOH negativi, le colonie sono esculina positive alla lampada di Wood.

Per differenziare i due ceppi, si sottopongono le colonie a una semina in BEA (Bile Esculin Azide Agar) e si incubano le piastre a 37°C per 18-24 ore.

Streptococcus uberis non cresce su questo tipo di terreno colturale, mentre gli Enterococchi crescono fermentando l'esculina che determina la comparsa di una colorazione nerastra delle colonie e della zona circostante ad esse, visibile ad occhio nudo.

- Identificazione di *Prototheca*:

Prototheca è una microalga unicellulare eterotrofa, immobile, le colonie in ASE sono puntiformi, la crescita è scarsa o assente dopo 24 ore, più evidente dopo 48 ore.

Prototheca è facilmente identificabile a vetrino mediante colorazione di Gram (si presenta con strutture grandi, di forma irregolare e di aspetto granuloso; le strutture ovalari si colorano di blu) oppure con la colorazione a fresco (*Prototheca* presenta sporangi sferici o ovali, con o senza endospore).

4.5 Minima concentrazione inibente (MIC)

Al fine di valutare la sensibilità microbica agli antibiotici è stata utilizzata, presso l'IZS^{Ve}, una metodica quantitativa chiamata microdiluizione in brodo. L'antibiotico viene solubilizzato in brodo di crescita a concentrazioni scalari 2-fold. In questo modo viene valutata la crescita microbica in terreni di coltura addizionati di concentrazioni scalari di differenti principi attivi, rappresentativi dei principali farmaci utilizzati per la terapia della mastite in ambito veterinario. Nel referto (Fig. 7) viene riportato il giudizio (sensibile, intermedio, resistente) oltre al valore di MIC per ogni molecola e la relativa scala di diluizioni. Viene inoltre riportato il valore breakpoint (BP) con il riferimento da cui è stato preso. Come ultima cosa è presente il quoziente BP, pari al rapporto tra il BP di sensibilità applicato e il valore di MIC rilevato, che relativizza i risultati e di conseguenza rende paragonabile l'attività delle diverse molecole. Tanto più alto è il BP tanto più è elevato l'azione diluente della molecola.

DETERMINAZIONE DELLA MIC PER MASTITE			279 - STREPTOCOCCUS AGALACTIAE derivato da LATTE CRUDO - 77		
(MICRODILUIZIONE IN BRODO / PDP DIA 149 2015 Rev. 0)					
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	Range (µg/mL)	Fonte BP
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/ 0,125	Sensibile	>32	0,25/0,125- 32/16	CLSI V
Ampicillina	<0,125	Sensibile	>2	0,125-32	CLSI V
Cefazolina	<0,125	Sensibile	>16	0,125-8	CLSI V
Cefoperazone	<0,125	Sensibile	>16	0,125-8	FEBLER 2012
Cefquinome	<0,125	Sensibile	>16	0,125-8	LUHOFER 2008 MORONI 2011
Enrofloxacin	0,5	Sensibile	1	0,125-4	CLSI V
Eritromicina	<0,125	Sensibile	>2	0,125-8	CLSI V
Gentamicina	8	Intermedio	0,5	1-16	CLSI V
Lincomicina	<1	Sensibile	>2	1-8	CASFM VET 2007
Oxacillina	0,25	Sensibile	1	0,125-4	CLSI V
Penicillina	<0,0625	Sensibile	>2	0,0625-16	CLSI V
Tilosina	1	Intermedio	0,25	0,25-2	LAM
Rifampicina	<1	Sensibile	>1	1-4	CLSI V
Spiramicina	<1	Sensibile	>1	1-4	CASFM VET 2007
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,25/ 4,75	Sensibile	>2	0,25/4,75- 4/76	CLSI V
Kanamicina	>16	Intermedio	<0,0625	2-16	NO BP

Figura 7: Esempio di referto di MIC prodotto dall'IZS^{Ve}.

4.6 Elaborazione dati ed analisi statistica

I dati ottenuti da questo studio sono stati inseriti ed elaborati attraverso Microsoft Excel.

Sono stati calcolati i valori di prevalenza dei patogeni ricercati a T0 per tutte le bovine coinvolte nello studio. Sono stati calcolati i valori di prevalenza a T1 e T2 delle bovine prelevate in queste fasi nelle tre aziende. Inoltre, sono stati inseriti i valori di MIC a T0, T1 e T2 per i vari patogeni divisi per le aziende in cui sono stati isolati.

5. Risultati

La tabella 3 illustra la prevalenza degli agenti patogeni ricercati nelle tre aziende oggetto di studio al campionamento in T0. Delle 944 bovine testate 107 (11%) sono risultate positive agli agenti di nostro interesse. *S. agalactiae* e *Prototheca spp* sono risultati gli agenti eziologici più isolati, rispettivamente nel 9% e nel 3% delle bovine, mentre *S. aureus* e *S. uberis* erano presenti solo nello 0,6% delle bovine.

Tabella 3: Prevalenza per tutte e tre le aziende dei patogeni isolati a T0.

	Azienda A		Azienda B		Azienda C		Totale
Bovine campionate	144		716		84		944
Bovine positive	18	22%	82	12%	7	8%	107 (11%)
Bovine positive a <i>S. aureus</i>	5	6%	0	0	1	1%	6 (0,6%)
Bovine positive a <i>S. agalactiae</i>	13	16%	55	8%	0	0	88 (9%)
Bovine positive a <i>Prototheca</i>	0	0	27	4%	0	0	27 (3%)
Bovine positive a <i>S. uberis</i>	0	0	0	0	6	7%	6 (0,6%)

Dato l'elevato numero di bovine, i campionamenti sono stati effettuati in due giornate consecutive. Il protocollo dell'IZSVE prevede l'esecuzione della MIC per solo un isolato della stessa specie per gruppo di campioni consegnati. Di conseguenza, se vengono consegnati campioni in due giorni diversi avremo due MIC per lo stesso agente eziologico. Questo spiega la distribuzione dei risultati delle tabelle 7, 8, 9, 10 e 17.

I risultati delle MIC esposti più avanti e nella discussione tengono conto della massima resistenza espressa da un patogeno. Ad esempio, se un patogeno a T0 risulta sensibile a un antimicrobico, a T1 intermedio e a T2 risulta resistente, verrà discusso come patogeno resistente. Nelle figure 8, 9 e 10 sono rappresentate le resistenze riassuntive dei tre patogeni.

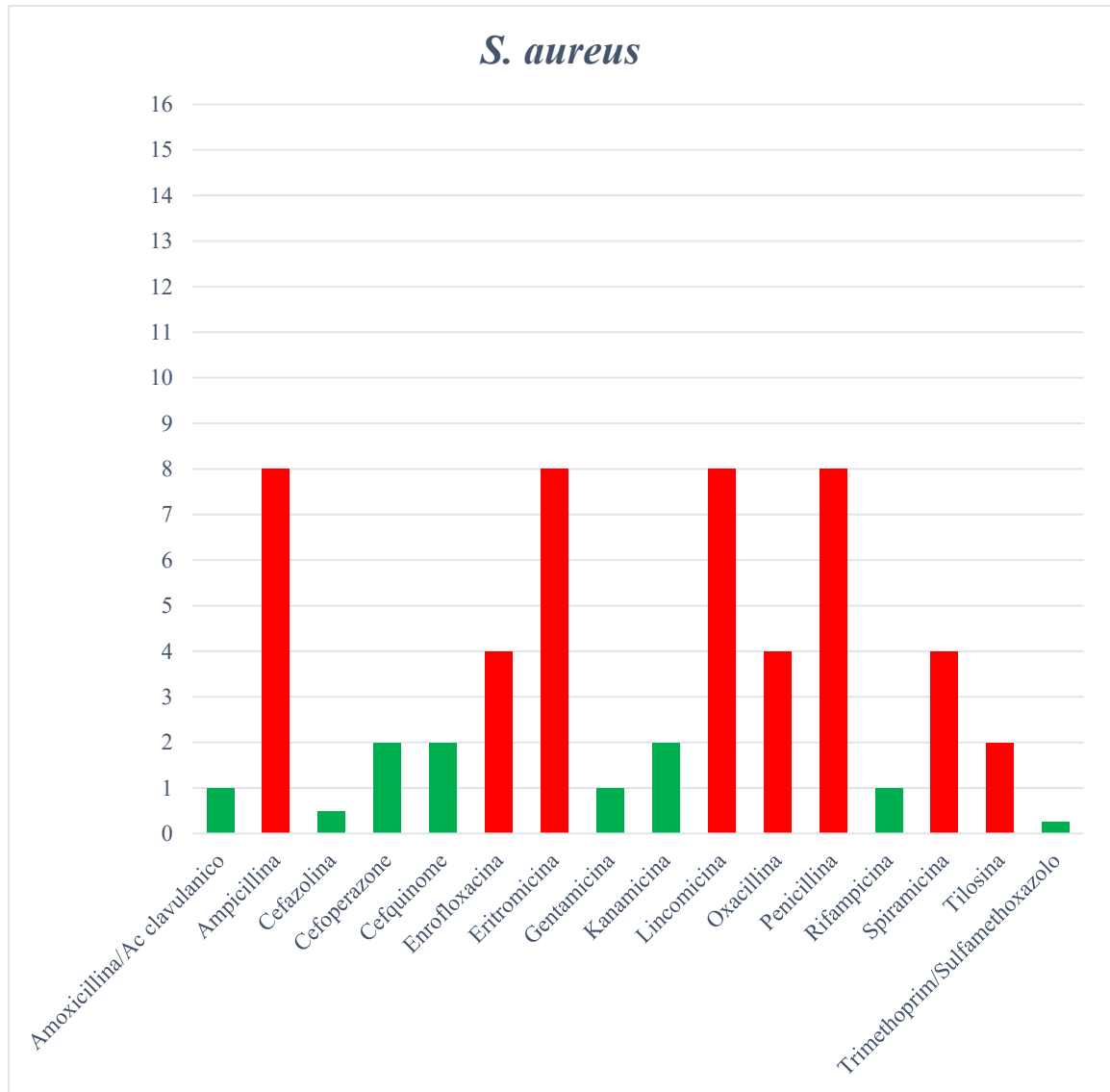


Figura 8: Grafico che rappresenta le resistenze complessive alla MIC di tutti gli isolati di *S. aureus*. In ordinata sono presenti i nomi dei farmaci e in ascissa le concentrazioni espresse in mg/ml. Le barre verdi rappresentano la sensibilità, le gialle l'intermedio, le rosse la resistenza.

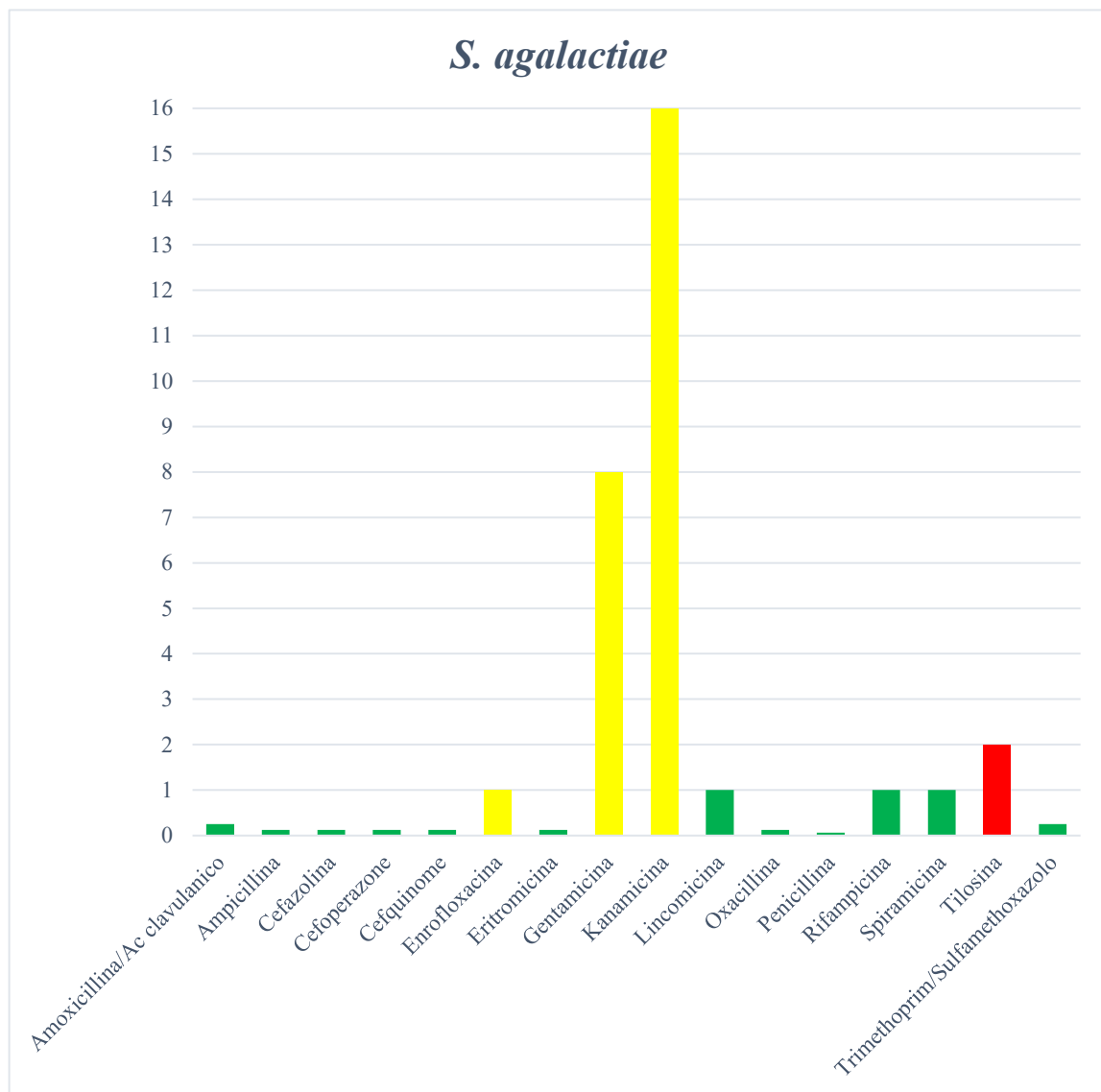


Figura 9: Grafico che rappresenta le resistenze complessive alla MIC di tutti gli isolati di *S. agalactiae*. in ordinata sono presenti i nomi dei farmaci e in ascissa le concentrazioni in mg/ml. Le barre verdi rappresentano la sensibilità, le gialle l'intermedio, le rosse la resistenza.

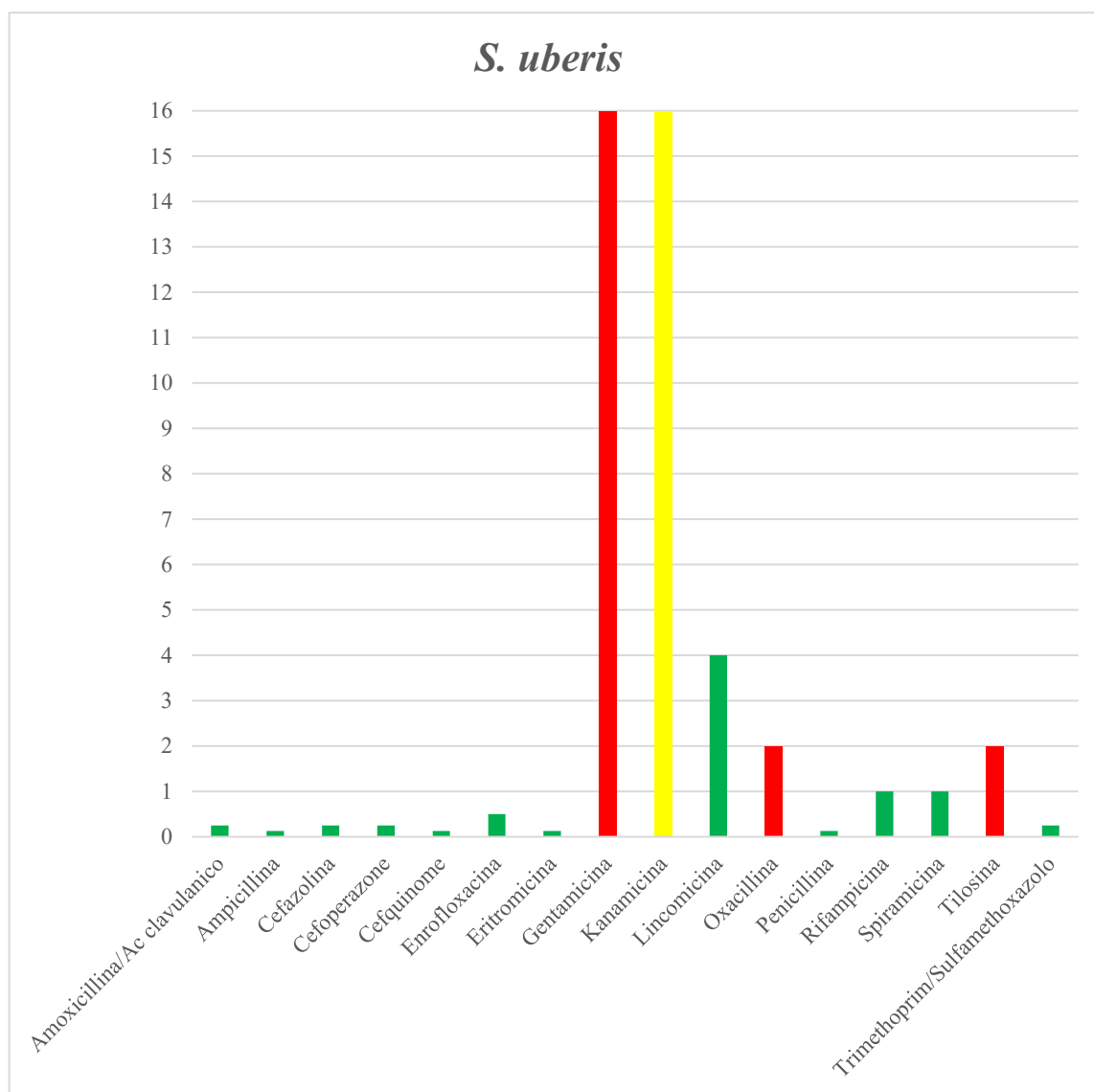


Figura 10: Grafico che rappresenta le resistenze complessive alla MIC di tutti gli isolati di *S. agalactiae*. in ordinata sono presenti i nomi dei farmaci e in ascissa le concentrazioni in mg/ml. Le barre verdi rappresentano la sensibilità, le gialle l'intermedio, le rosse la resistenza

5.1 Azienda A

Prevalenza T1

Delle 18 bovine positive a T0, a T1 ne sono state campionate 14, poiché le restanti erano state riformate o messe in asciutta. Oltre alle bovine positive a T0 sono state campionate 4 bovine di controllo e 20 bovine con SCC elevato. A causa della escrezione intermittente di *S. aureus* è stato pensato di prelevare 20 bovine con SCC >200000 in modo da identificare altri casi positivi. Due bovine di questo gruppo sono risultate positive per *S. agalactiae*. Delle 14 rilevate infette a T0, 7 sono risultate positive a T1. Delle 4 bovine di controllo, 1 è risultata positiva. I risultati sono illustrati nella Tab. 5.

Prevalenza T2

Delle 18 bovine positive a T0, a T2 ne sono state campionate 14, poiché la restante erano state riformate o poste in asciutta. Oltre alle bovine positive a T0 sono state campionate 6 bovine di controllo e una bovina con SCC elevato delle due positive in T1. I risultati sono illustrati nella Tab. 6.

Minima Concentrazione Inibente

S. agalactiae è risultato intermedio a enrofloxacin e kanamicina e resistente alla tilosina.

S. aureus è risultato resistente ad ampicillina, enrofloxacin, eritromicina, lincomicina, oxacillina, spiramicina e tilosina.

I risultati sono illustrati nelle Tab. 7, 8, 9 e 10.

Tabella 4: Bovine positive a T1 nell'azienda A.

Azienda A	Positive a T1		
	Totali	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
Controllo (sane a T0) n=4	1/4	0	1/4
Positive a T0 n=14	7/14	3/14	4/14
Cell >200000/ml n=20	2/20	0	2/20
Totale prelevate n=38	10/38	3/38	7/38

Tabella 5: Bovine positive a T2 nell'azienda A.

Azienda A	Positive a T2		
	Totali	<i>S. aureus</i>	<i>S. agalactiae</i>
Controllo (sane a T1) n=4	1/4	0	1/4
Positive a T0 n=14	7*/14	3/14	5/14
Cell >200000/ml N=1	1/1	0	1/1
Totale prelevate n=19	9/19	3/19	8/19

* 1 bovina infetta da due patogeni in contemporanea

Tabella 6: MIC per *S. agalactiae* di T0 e del primo campionamento di T1 dell'azienda A.

MIC Azienda A <i>S. agalactiae</i>	T0-primo campionamento			T0-secondo campionamento			T1-primo campionamento		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/ 0,125	S	>32	<0,25/0,1 25	S	>32	<0,25	S	>32
Ampicillina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Cefazolina	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefoperazone	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefquinome	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Enrofloxacin	0,5	S	1	0,5	S	1	1	I	0,5
Eritromicina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Gentamicina	4	S	1	2	S	2	4	S	1
Kanamicina	>16	I	<0,0625	>16	I	<0,0625	<1	I	>2
Lincomicina	<1	S	>2	<1	S	>2	<0,125	S	>2
Oxacillina	0,25	S	1	0,25	S	1	<0,0625	S	>2
Penicillina	<0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2	1	S	0,25
Rifampicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Spiramicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Tilosina	1	I	0,25	1	I	0,25	<0,25/4, 75	I	>2
Trimethoprim/Sulfamethoxa zolo	<0,25/4, 75	S	>2	<0,25/4,7 5	S	>2	>16	S	<0,0625

Tabella 7: MIC per *S. agalactiae* del secondo campionamento di T1 e di T2 dell'azienda A.

MIC Azienda A <i>S. agalactiae</i>	T1-secondo campionamento			T2-primo campionamento			T2-secondo campionamento		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/0,1 25	S	>32	<0,25/0,1 25	S	>32	<0,25/0,1 25	S	>32
Ampicillina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Cefazolina	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefoperazone	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefquinome	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Enrofloxacin	1	I	0,5	0,5	S	1	0,5	S	1
Eritromicina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Gentamicina	4	S	1	4	S	1	<1	S	>4
Kanamicina	>16	I	<0,0625	>16	I	<0,0625	8	I	0,125
Lincomicina	<1	S	>2	<1	S	>2	<1	S	>2
Oxacillina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	0,25	S	>2
Penicillina	<0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2
Rifampicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Spiramicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Tilosina	1	I	0,25	1	I	0,25	>2	R	/
Trimethoprim/Sulfamethox azolo	<0,25/4,7 5	S	>2	<0,25/4,7 5	S	>2	<0,25/4,7 5	S	>2

Tabella 8: MIC per *S. aureus* di T0 e del primo campionamento di T1 dell'azienda A.

MIC Azienda A <i>S. aureus</i>	T0-primo campionamento			T0-secondo campionamento			T1-primo campionamento		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te	MIC (µg/mL)	Giudizi o	Quozien te
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/0,125	S	>16	<0,25/0,125	S	>16	1/0,5	S	4
Ampicillina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	8	R	/
Cefazolina	0,5	S	4	0,5	S	4	0,5	S	4
Cefoperazone	2	S	1	2	S	1	2	S	1
Cefquinome	1	S	2	1	S	2	2	S	1
Enrofloxacin	>4	R	/	<0,125	S	>4	<0,125	S	>4
Eritromicina	0,5	S	1	0,5	S	1	>8	R	/
Gentamicina	<1	S	>4	<1	S	>4	<1	S	>4
Kanamicina	<2	S	>4	<2	S	>4	<2	S	>4
Lincomicina	<1	S	>2	<1	S	>2	2	S	1
Oxacillina	0,5	S	4	0,25	S	8	4	R	/
Penicillina	<0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2	8	R	/
Rifampicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Spiramicina	>4	R	/	4	R	/	>4	R	/
Tilosina	2	R	/	2	R	/	>2	R	/
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,25/4,75	S	>8	<0,25/4,75	S	>8	<0,25/4,75	S	>8

Tabella 9: MIC per *S. aureus* del secondo campionamento di T1 e del primo di T2 dell'azienda A.

MIC Azienda A <i>S. aureus</i>	T1-secondo campionamento			T2-primo campionamento		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente
Amoxicillina/Ac clavulanico	1/0,5	S	4	0,5/0,25	S	8
Ampicillina	8	R	7	8	R	/
Cefazolina	0,5	S	4	0,5	S	4
Cefoperazone	2	S	1	2	S	1
Cefquinome	1	S	2	0,5	S	4
Enrofloxacin	<0,125	S	>4	<0,125	S	>4
Eritromicina	>8	R	/	0,25	S	2
Gentamicina	<1	S	>4	<1	S	>4
Kanamicina	<2	S	>4	4	S	2
Lincomicina	>8	R	/	<1	S	>2
Oxacillina	0,5	S	4	0,5	S	4
Penicillina	8	R	/	8	S	/
Rifampicina	<1	S	>1	<1	R	>1
Spiramicina	>4	R	/	>4	R	/
Tilosina	>2	R	/	>2	R	/
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,25/ 4,75	S	>8	<0,25/ 4,75	S	>8

5.2 Azienda B

Prevalenza T1

Delle 82 bovine positive a T0, a T1 ne sono state campionate 42, poiché le restanti erano state riformate o asciugate. Oltre alle bovine positive a T0 sono state campionate 12 bovine di controllo. Delle 42 rilevate infette a T0, 37 sono risultate positive a T1. Delle 12 bovine di controllo, 2 sono risultate positive. I risultati sono illustrati nella Tab. 11.

Prevalenza T2

Delle 82 bovine positive a T0, a T2 ne sono state campionate 35. Oltre alle bovine positive a T1 sono state campionate 10 bovine di controllo. I risultati sono illustrati nella Tab. 12.

Minima concentrazione inibente

S. agalactiae è risultato intermedio a gentamicina, kanamicina e tilosina.

Data la comprovata resistenza di *Prototheca* agli antibiotici tradizionali, non è stato effettuato antibiogramma per questo patogeno.

I risultati sono illustrati nella Tab. 13.

Tabella 10: Bovine positive a T1 nell'azienda B.

Azienda B	Positive a T1		
	Totali	<i>S. agalactiae</i>	<i>Prototheca</i>
Controllo (sane a T0) n=12	2/12	1/8	1/8
Positive a T0 n=42	37*/42	31/42	13/42
Totali n=54	39*/54	32/54	14/54

*7 bovine infette dai due patogeni in contemporanea.

Tabella 11: Bovine positive a T2 nell'azienda B

Azienda B	Positive a T2		
	Totali	<i>S. agalactiae</i>	<i>Prototheca</i>
Controllo (sane a T1) n=10	1/10	1/10	0
Positive a T0 n=35	26*/35	19/35	8/35
Totali n=45	27*/45	20/45	8/45

*1 bovina infetta da due patogeni in contemporanea.

Tabella 12: MIC di *S. agalactiae* per T0, T1 e T2 dell'azienda B

MIC Azienda B <i>S. agalactiae</i>	T0			T1			T2		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente
Amoxicillina/Acclavulanico	<0,25/0,125	S	>32	<0,25/0,125	S	>32	<0,25/0,125	S	>32
Ampicillina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Cefazolina	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefoperazone	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Cefquinome	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Enrofloxacin	0,5	S	1	0,5	S	1	0,25	S	2
Eritromicina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Gentamicina	8	I	0,5	8	I	0,5	4	S	1
Kanamicina	>16	I	<0.0625	>16	I	<0.0625	>16	I	<0.0625
Lincomicina	<1	S	>2	<1	S	>2	<1	S	>2
Oxacillina	0,25	S	1	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Penicillina	0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2	<0,0625	S	>2
Rifampicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Spiramicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Tilosina	1	I	0,25	1	I	0,25	0,5	I	0,5
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,25/4,75	S	>2	<0,25/4,75	S	>2	<0,25/4,75	S	>2

5.3 Azienda C

Prevalenza T1

Sono state campionate tutte le 7 bovine positive a T0. Oltre a queste sono state campionate 6 bovine di controllo, risultate tutte negative. I risultati sono illustrati nella Tab. 14.

Prevalenza T2

Sono state campionate tutte e 7 le bovine positive a T0. Oltre a queste sono state campionate 6 bovine di controllo, risultate tutte negative. I risultati sono illustrati nella Tab. 15.

Minima concentrazione inibente

S. aureus è risultato presente solo a T0 ed è risultato intermedio alla spiramicina e resistente a eritromicina, lincomicina e tilosina.

S. uberis è risultato intermedio alla kanamicina e resistente a gentamicina, oxacillina e tilosina.

La MIC per questi patogeni è illustrata nelle tabelle 16 e 17.

Tabella 13: Bovine positive a T1 nell'azienda C.

Azienda C	Positive a T1		
	Totali	<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>
Controllo (sane a t0) n=6	0	0	0
Positive a t0 n=7	2/13	0	2/13
Totali n=13	2 /13	0	2/13

Tabella 14: Bovine positive a T2 nell'azienda C.

Azienda C	Positive a T2		
	Totali	<i>S. aureus</i>	<i>S. uberis</i>
Controllo (sane a t1) n=6	0	0	0
Positive a T0 n=7	1/7	0	1/7
Totale n=13	1/13	0	1/13

Tabella 15: MIC per *S. aureus* a T0 dell'azienda C.

MIC Azienda C <i>S aureus</i>	T0		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/0,125	S	>16
Ampicillina	<0,125	S	>2
Cefazolina	<0,125	S	>16
Cefoperazone	0,5	S	4
Cefquinome	0,25	S	8
Enrofloxacin	<0,125	S	>4
Eritromicina	>8	R	-
Gentamicina	<1	S	>4
Kanamicina	<2	S	>4
Lincomicina	>8	R	-
Oxacillina	0,5	S	4
Penicillina	<0,0625	S	>2
Rifampicina	<1	S	>1
Spiramicina	2	I	0,5
Tilosina	>2	R	-
Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	<0,25/4,75	S	>8

Tabella 16. MIC per *S. uberis* a T0 e T1 dell'azienda C.

MIC Azienda C <i>S. uberis</i>	T0-primo campionamento			T0-secondo campionamento			T1-primo campionamento		
Molecola	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente	MIC (µg/mL)	Giudizio	Quoziente
Amoxicillina/Ac clavulanico	<0,25/0, 125	S	>32	<0,25/0, 125	S	>32	<0,25/0, 125	S	>32
Ampicillina	0,125	S	>2	0,13	S	>2	0,125	S	>2
Cefazolina	0,25	S	8	0,25	S	8	0,5	S	4
Cefoperazone	1	S	2	0,25	S	8	1	S	2
Cefquinome	0,125	S	>16	<0,125	S	>16	<0,125	S	>16
Enrofloxacin	0,5	S	1	0,5	S	1	0,25	S	2
Eritromicina	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2	<0,125	S	>2
Gentamicina	4	S	1	<1	S	>4	16	R	-
Kanamicina	16	I	>2	16	I	0	>16	S	0,0625
Lincomicina	<1	S	>2	2	S	1	4	S	0,5
Oxacillina	1	R	-	1	R	-	2	R	-
Penicillina	<0,0625	S	>2	<0,125	S	1	0,125	S	1
Rifampicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Spiramicina	<1	S	>1	<1	S	>1	<1	S	>1
Tilosina	1	I	0,25	1	I	1	2	R	-
Trimethoprim/Sulfamet hoxazolo	<0,25/4, 75	S	>2	<0,25/4, 75	S	>2	<0,25/4, 75	S	>2

6. Discussione

6.1 Prevalenza

I dati riguardanti la prevalenza dei patogeni contagiosi a livello di mandria e a livello di singola bovina risultano di notevole importanza, dato la difficoltà nel reperire dati aggiornati a livello del territorio italiano (Zecconi et al., 2020).

La prevalenza di *S. aureus* a livello di singola bovina nelle aziende oggetto di indagine è stata dello 0,6%, molto inferiore a quanto presentano alcuni autori, sia sul territorio nazionale (Ferguson et al., 2007; Zecconi and Zanirato, 2013) sia all'estero (Tenhagen et al., 2006; Abebe et al., 2016).

S. agalactiae è stato l'agente patogeno maggiormente isolato (9%). In alcuni paesi come Belgio (Piepers et al., 2007), Danimarca (Katholm et al., 2012) e Norvegia (Jørgensen et al., 2016) questo microrganismo è quasi eradicato e ha una prevalenza molto ridotta. In altri paesi la prevalenza può essere molto maggiore, arrivando anche al 30% (Azevedo et al., 2016). Nelle precedenti indagini svolte in Italia (Ferguson et al., 2007; Zecconi and Zanirato, 2013) la prevalenza è risultata essere intorno al 3%.

S. aureus e *S. agalactiae* sono due patogeni molto simili per quanto riguarda i piani di controllo: di massima importanza risulta l'igiene durante la mungitura e l'identificazione e isolamento dei casi positivi. La differenza di prevalenza notevole di questi due patogeni può essere spiegata con l'adattamento ambientale di alcuni ceppi di *S. agalactiae* (Jørgensen et al., 2016; Cobo-Ángel et al., 2018) che potrebbe contribuire a rimodellare i piani di controllo di questo agente.

S. uberis colpisce le bovine subito dopo il parto e tendenzialmente ha una prevalenza inferiore al 10% (Ferguson et al., 2007; Constable et al., 2016). La ridottissima prevalenza di questo patogeno nelle aziende in esame (0,6%) può indicare un corretto management ambientale e soprattutto un efficace protocollo di asciugatura e gestione del periparto nelle bovine.

Prototheca spp. è stato isolato nel 3% delle bovine. Negli studi presenti in letteratura, la prevalenza a livello di bovina risultava variabile ma comunque intorno al 10% (Bozzo et al., 2014; Jagielski et al., 2019). Negli anni precedenti questo patogeno è stato frequentemente sottovalutato ma a causa della sua elevatissima resistenza ambientale e dell'assenza di cure efficaci può causare gravi danni alle aziende zootecniche colpite.

6.2 MIC

I risultati preliminari ottenuti in questo studio possono essere utili per identificare protocolli terapeutici da applicare a bovine con mastite clinica e subclinica. Per quanto ogni trattamento antibiotico debba essere fatto seguendo un antibiogramma, se viene creata una “banca dati” a livello di singolo allevamento zootecnico contenente le sensibilità dei principali patogeni è possibile iniziare con una terapia alla cieca e poi procedere alla de-escalation una volta avuti i risultati. In Fig.11 sono riportate le linee guida della regione Emilia Romagna (2018), che dovrebbero essere integrate con le linee guida dell’EMA del 2019 per utilizzare, dove possibile, gli antibiotici di prima scelta in classe D.

Microrganismo	1° scelta	2° scelta	3° scelta
<i>S. agalactiae</i> <i>S. dysgalactiae</i> <i>S. uberis</i> <i>Enterococchi</i>	<i>Terapia intramammaria:</i> Penicilline* Cefalosporine 1-2 gen Amfenicoli (Tiamfenicolo) Lincosamidi (Lincomicina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Penicilline** Ansamicine (Rifaximina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Cefalosporine 3-4 gen
<i>S.aureus</i> βLatt- SNC βLatt-	<i>Terapia intramammaria:</i> Penicilline* Cefalosporine 1-2 gen Amfenicoli (Tiamfenicolo) Lincosamidi (Lincomicina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Penicilline** Ansamicine (Rifaximina) <i>Ev. associata a ter. parent:</i> Lincosamidi (Lincomicina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Cefalosporine 3-4 gen Macrolidi <i>Ev. associata a ter.parenterale:</i> Macrolidi Fluorochinoloni Cefalosporine di 3-4 gen
<i>S. aureus</i> βLatt+ SNC βLatt+	Valutare se appropriata <i>Terapia intramammaria:</i> Penicilline* Cefalosporine 1-2 gen Amfenicoli (Tiamfenicolo) Lincosamidi (Lincomicina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Ansamicine (Rifaximina) <i>Ev associata a ter.parent:</i> Lincosamidi (Lincomicina)	<i>Terapia intramammaria:</i> Cefalosporine 3-4 gen Macrolidi <i>Ev. associata a ter.parenterale:</i> Macrolidi Fluorochinoloni Cefalosporine 3-4 gen
<i>Escherichia coli</i>	Valutare se appropriata <i>Ter. parenterale:</i> Sulfamidici Sulfamidici potenziati		<i>Ter. parenterale:</i> Fluorochinoloni Cefalosporine 3-4 gen

*Penicilline di prima scelta: Oxacillina, Cloxacillina, Dicloxacillina, Nafcillina
**Penicilline di seconda scelta: Ampicillina, Amoxicillina, Penicillina, Penetamato

Figura 11: Linee guida riguardanti la scelta dell’antibiotico in caso di mastite. Da linee guida della Regione Emilia Romagna, 2018.

Nell’azienda A *S. agalactiae* è risultato intermedio a enrofloxacin e kanamicina e resistente alla tilosina mentre nell’azienda B è risultato intermedio a gentamicina, kanamicina e tilosina.

La bibliografia riporta rari casi di antimicrobico resistenza, perlopiù legati alla formazione di biofilm (Boonyayatra and Pata., 2016), ed è comunque concorde nel riportare una quasi assoluta

sensibilità alle penicilline, che rende *S. agalactiae* facilmente trattabile anche durante la lattazione (Gao et al., 2012; Ding et al., 2016). I risultati degli antibiogrammi della nostra prova non si discostano da quelli presentati. Può sembrare superfluo, visti questi dati, effettuare una MIC una volta isolato il patogeno; tuttavia di recente sono stati isolati nell'uomo e in altri animali dei ceppi non suscettibili alle penicilline e alla cefotaxima (Li et al., 2020) che potrebbero limitare enormemente le scelte terapeutiche sia in medicina umana sia in medicina animale. Di conseguenza dovrebbe essere sempre effettuato un antibiogramma in modo da identificare l'insorgenza di antimicrobico resistenza e poterla segnalare e contrastare.

Nell'unica azienda dove è stato isolato, ovvero l'azienda C, *S. uberis* è risultato intermedio alla kanamicina e resistente a gentamicina, oxacillina e tilosina. I risultati ottenuti sono coerenti con la bibliografia, che vede *S. uberis* tendenzialmente sensibile alle amminopenicilline e cefalosporine e resistente all'oxacillina (Tenhagen et al., 2006; Cameron et al., 2016; Käppeli et al., 2019). Seguendo le linee guida della regione Emilia Romagna (2018) e integrandole con le linee guida dell'EMA (2019) in questo caso potremmo utilizzare delle cefalosporine di 1^a o 2^a generazione, degli amfenicoli o dei lincosamidi. Nonostante tutti questi siano di classe C abbiamo un antibiogramma che ne attesta l'efficacia ed essendo dei farmaci di prima scelta possiamo utilizzarli senza problemi.

Nell'azienda A *S. aureus* è risultato resistente a ad ampicillina, enrofloxacin, eritromicina, lincomicina, oxacillina, spiramicina e tilosina mentre nell'azienda C *S. aureus* è risultato intermedio alla spiramicina e resistente a eritromicina, lincomicina e tilosina

S. aureus è uno dei patogeni più importanti nell'ambito della medicina veterinaria e umana dato che è potenzialmente capace di sviluppare resistenza a qualsiasi agente antimicrobico (De Los Santos et al, 2017; Pérez et al., 2020). L'elevata resistenza agli antimicrobici, la localizzazione intracellulare e la produzione di biofilm contribuiscono al difficile trattamento di questo patogeno che spesso si conclude con l'obbligatoria riforma dell'animale (Barkema et al., 2006).

Di notevole importanza è l'isolamento di uno *S. aureus* resistente all'oxacillina (classificato quindi come MRSA): questo patogeno viene identificato come uno dei principali pericoli verso la salute pubblica (Köck et al., 2010; Dweba et al., 2018). Infatti, oltre alla resistenza a buona parte degli antibiotici, gli *S. aureus* MRSA possono perdere facilmente il tropismo ospite specifico ed essere trasmessi dai bovini all'uomo o viceversa (Magro et al., 2018). Non è

escludibile, quindi, che l'allevatore stesso o uno degli addetti alla mungitura possano aver introdotto il patogeno in azienda.

In ambito di *One Health* risulterebbe fondamentale l'isolamento e il riconoscimento dei patogeni multiresistenti. Sono difficili da curare con le terapie antibiotiche, di conseguenza è fondamentale limitarne la diffusione tra gli allevamenti. Esiste la possibilità che si verifichi spillover, risultando patogeni per l'uomo. Sono in grado di trasmettere i loro geni di resistenza ad altri patogeni, acuendo il problema dell'AMR.

Nel caso si sospetti questo patogeno è dunque fondamentale effettuare gli esami batteriologici comprensivi di MIC e in generale attuare delle corrette e rigorose procedure di biosicurezza e igiene in fase di mungitura.

L'Unione Europea ha bandito nel 1999 l'utilizzo della tilosina e di altri promotori di crescita in Medicina Veterinaria. L'elevata resistenza di molti dei patogeni isolati a questo antimicrobico dimostra come sia stata corretta e previdente questa scelta normativa.

I risultati ottenuti potrebbero essere utili alle aziende esaminate per lo sviluppo di nuovi protocolli per l'uso di antibiotici. L'azienda C utilizza come protocollo terapeutico per le mastiti fluimastin endomammario (tiamfenicolo) mentre l'azienda A utilizza cefamixin I (rifaximina). Questi farmaci vengono somministrati senza valutare quale sia l'agente patogeno e la sensibilità di questo all'antimicrobico: dato che questi farmaci rientrano nella categoria C dell'EMA la somministrazione dovrebbe essere effettuata solo se sono farmaci di prima scelta e si ha un antibiogramma che ne dimostra l'efficacia. Con la collaborazione del veterinario aziendale, una figura introdotta con il DM 07.12.2017 che ha il compito di gestire il farmaco in allevamento, potrebbe essere consigliabile sviluppare un protocollo terapeutico di attacco (trattamento in attesa dei risultati dell'esame batteriologico) che utilizzi farmaci di classe D a cui i patogeni sono risultati precedentemente sensibili in attesa dell'esame batteriologico che può indicare un'eventuale de-escalation.

7. Conclusioni

Nonostante siano solo risultati preliminari di uno studio molto più ampio, i dati che abbiamo raccolto hanno fornito delle informazioni rilevanti.

L'isolamento di un ceppo di MRSA conferma l'importanza della valutazione batteriologica delle mastiti cliniche e subcliniche, sia in termini di scelta del trattamento terapeutico, sia per procedere a un rapido isolamento o riforma delle bovine affette da questo patogeno. L'isolamento di questo microrganismo potrebbe permettere inoltre una possibile tracciabilità dell'eventuale spillover tra animale e uomo o uomo e animale.

L'elevata prevalenza di *S. agalactiae* rispetto agli altri microrganismi contagiosi potrebbe suggerire un adattamento ambientale di questo patogeno.

I risultati di prevalenza dei vari patogeni risultano utili per valutare la situazione territoriale del Veneto, visto che tali dati risultavano scarsamente presenti in bibliografia.

I risultati dell'esame della MIC potrebbero contribuire a sviluppare, in accordo e cooperazione con il veterinario aziendale, dei protocolli terapeutici efficaci e che tengano conto delle varie linee guida europee al fine di limitare l'uso di antibiotico e di ridurre l'insorgenza di antimicrobico resistenza.

Ulteriori studi sono necessari per confermare i dati di prevalenza ottenuti da questo studio e ottenere una visione più ampia sulle varie resistenze dei principali patogeni contagiosi, al fine di migliorare la qualità del latte, il benessere animale, l'uso dell'antibiotico e i protocolli di igiene aziendale e biosicurezza.

8. Bibliografia

1. Abebe R., Hatiya H., Abera M., Megersa B. and Asmare, K. (2016). Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and isolation of *Staphylococcus aureus* in dairy herds at Hawassa milk shed, South Ethiopia. In *BMC Veterinary Research* (Vol. 12, Issue 1).
2. Adhikari N., Bonaiuto H. E. and Lichtenwalner A. B. (2013). Short communication: Dairy bedding type affects survival of *Prototheca* in vitro. *Journal of Dairy Science*, 96(12), 7739–7742.
3. Aebi M., Van den Borne B. H. P., Raemy A., Steiner A., Pilo P. and Bodmer M. (2015). *Mycoplasma bovis* infections in Swiss dairy cattle: A clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 57(1), 1–11.
4. Alhussien M. N. and Dang A. K. (2018). Milk somatic cells, factors influencing their release, future prospects, and practical utility in dairy animals: An overview. *Veterinary World*, 11(5), 562–577.
5. Almeshdar H., El-Fakharany E., Uversky V. and Redwan E. (2015). Disorder in Milk Proteins: Structure, Functional Disorder, and Biocidal Potentials of Lactoperoxidase. *Current Protein & Peptide Science*, 16(4), 352–365.
6. Ashraf A. and Imran M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: from laboratory to farm. In *Tropical Animal Health and Production* (Vol. 50, Numero 6, pagg. 1193–1202). Springer Netherlands.
7. Azevedo C., Pacheco D., Soares L., Moitoso M., Maldonado J., Guix R. and Simões J. (2016). Prevalence of bovine milk pathogens in Azorean pastures: mobile versus fixed milking machines. *Veterinary Record Open* 3: e000181.
8. Barkema H. W., Green M. J., Bradley A. J. and Zadoks R. N. (2009). Invited review: The role of contagious disease in udder health. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 4717–4729.
9. Barkema H. W., Schukken Y. H., Lam T. J. G. M., Galligan D. T., Beiboer M. L. and Brand A. (1997). Estimation of Interdependence among Quarters of the Bovine Udder with Subclinical Mastitis and Implications for Analysis. *Journal of Dairy Science*, 80(8), 1592–1599.

10. Barkema H.W., Schukken Y.H. and Zadoks R.N. (2006). Invited review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89(6), 1877–1895.
11. Blowey R. and Edmondson P. (2010). Mastitis Control in Dairy Herds. CAB International; 2nd ed.; Cap 3, pp.20-32.
12. Boonyayatra S. and Pata P. (2016). Antimicrobial Resistance of Biofilm-Forming *Streptococcus agalactiae* Isolated from Bovine Mastitis. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7(5).
13. Bozzo G., Bonerba E., Di Pinto A., Bolzoni G., Ceci E., Mottola A., Tantillo G. and Terio V. (2014). Occurrence of *Prototheca* spp. in cow milk samples. *New Microbiologica*, 37(4), 459–464.
14. Busanello M., Rossi R. S., Cassoli L. D., Pantoja J. C. F. and Machado P. F. (2017). Estimation of prevalence and incidence of subclinical mastitis in a large population of Brazilian dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 100(8), 6545–6553.
15. Cameron M., Keefe G. P., Roy J. P., Stryhn H., Dohoo I. R. and McKenna, S. L. (2015). Evaluation of selective dry cow treatment following on-farm culture: Milk yield and somatic cell count in the subsequent lactation. *Journal of Dairy Science*, 98(4), 2427–2436.
16. Cameron M., Saab M., Heider L., McClure J. T., Rodriguez-Lecompte J. C. and Sanchez J. (2016). Antimicrobial susceptibility patterns of environmental streptococci recovered from bovine milk samples in the Maritime Provinces of Canada. *Frontiers in Veterinary Science*, 3(SEP).
17. Chambers J. A., Crumlish M., Comerford D. A. and O'carroll R. E. (2020). Antimicrobial resistance in humans and animals: Rapid review of psychological and behavioral determinants. *Antibiotics*, 9(6).
18. Chaneton L., Tirante L., Mait, J., Chaves J. and Bussmann L. E. (2008). Relationship between milk lactoferrin and etiological agent in the mastitic bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 1865–1873.
19. Cobo-Ángel C., Jaramillo-Jaramillo A. S., Lasso-Rojas L. M., Aguilar-Marin S. B., Sanchez J., Rodriguez-Lecompte J. C., Ceballos-Márquez A. and Zadoks R. N. (2018). *Streptococcus agalactiae* is not always an obligate intramammary pathogen: Molecular

- epidemiology of GBS from milk, feces and environment in Colombian dairy herds. *PloS one*, 13(12), e0208990.
20. Constable P.D., Hinchcliff K.W., Done S.H. and Grümberg W. (2016). VETERINARY MEDICINE: A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats, eleventh edition. Elsevier Health Sciences; 11th ed.; Cap 20, pp. 1904-1991
 21. Contreras G. A. and Rodríguez J. M. (2011). Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. *J. Mammary Gland Biology and Neoplasia* 16, 339–356.
 22. Costa E. O., Ribeiro A. R., Melville P. A., Prada M. S., Carciofi A. C. and Watanabe E. T. (1996). Bovine mastitis due to algae of the genus *Prototheca*. *Mycopathologia*, 133(2), 85–88.
 23. Cremonesi P., Pozzi F., Ricchi M., Castiglioni B., Luini M. and Chessa S. (2012). Technical note: Identification of *Prototheca* species from bovine milk samples by PCR-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science*; 95(12):6963–8
 24. Davies P. L., Leigh J. A., Bradley A. J., Archer S. C., Emes R. D. and Green M. J. (2016). Molecular epidemiology of streptococcus uberis clinical mastitis in dairy herds: Strain heterogeneity and transmission. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(1), 68–74.
 25. De Los Santos R. I., Zunino P. M., Gil A. D., Laport A. and Hirigoyen D. J. (2017). Antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* associated with subclinical and clinical mastitis in Uruguay during an eight-year period. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 49(3), 191–194.
 26. Dellman H. D. and Eurell J. A. (2012). Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria. Casa Editrice Ambrosiana, II ed italiana; Cap 16, pp. 433-435
 27. Ding Y., Zhao J., He X., Li M., Guan H., Zhang Z. and Li P. (2016). Antimicrobial resistance and virulence-related genes of *Streptococcus* obtained from dairy cows with mastitis in Inner Mongolia, China. *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 162–167.
 28. Dingwell R. T., Leslie K. E., Schukken Y. H., Sargeant J. M. and Timms L. L. (2003). Evaluation of the California mastitis test to detect an intramammary infection with a major pathogen in early lactation dairy cows. In *COMMUNICATIONS COMMUNICATIONS BRÈVES (Traduit par Docteur André Blouin) Can Vet J* (Vol. 44).
 29. Djabri B., Bareille N., Beaudeau F. and Seegers H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary research*, 33(4), 335–357.

30. Dudek K., Nicholas R. A. J., Szacawa E. and Bednarek D. (2020). Mycoplasma bovis infections-Occurrence, diagnosis and control. *Pathogens*, 9(8), 1–21.
31. Dufour S., Dohoo I. R., Barkema H. W., DesCôteaux L., DeVries T. J., Reyher K. K., Roy J. P. and Scholl D. T. (2012). Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of Staphylococcus aureus intramammary infections in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(3), 1283–1300.
32. Dweba C.C., Zishiri O.T. and El Zowalaty M.E. (2018). Methicillin-resistant staphylococcus aureus: Livestock-associated, antimicrobial, and heavy metal resistance. *Infection and Drug Resistance*, 11, 2497–2509.
33. Economou V. and Gousia P. (2015). Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. *Infection and Drug Resistance*;8:49-61.
34. Edmondson P. (2011). Blitz therapy for the eradication of Streptococcus agalactiae infections in dairy cattle. *In Practice*; 33:33-37.
35. Enginler S. Ö., Sabuncu A., Kahraman B. B., Koçak Ö., Yildar E. and Güzel Ö. (2015). Comparison of intramammary ozone administration doses in dairy cows with clinical mastitis. *Acta Scientiae Veterinariae*, 43(1), 1–7.
36. Erskine R. J., Wagner S. and DeGraves F. J. (2003). Mastitis therapy and pharmacology. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 19(1), 109–vi.
37. Erskine R.J. and Eberhart R.J (1990). Herd benefit-to-cost ratio and effects of a bovine mastitis control program that includes blitz treatment of Streptococcus agalactiae. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 196(8):1230-1235.
38. Ezzat Alnakip M., Quintela-Baluja M., Böhme K., Fernández-No I., Caamaño-Antelo S., Calo-Mata P. and Barros-Velázquez J. (2014). The Immunology of Mammary Gland of Dairy Ruminants between Healthy and Inflammatory Conditions. *Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 1–31.
39. Ferguson J. D., Azzaro G., Gambina M. and Licitra G. (2007). Prevalence of mastitis pathogens in Ragusa, Sicily, from 2000 to 2006. *Journal of Dairy Science*, 90(12), 5798–5813.
40. Fox L. K. and Gay J. M. (1993). Contagious mastitis. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 9(3), 475–487.

41. Gao J., Yu F. Q., Luo L. P., He J. Z., Hou R. G., Zhang H. Q., Li S. M., Su J. L. and Han B. (2012). Antibiotic resistance of *Streptococcus agalactiae* from cows with mastitis. *Veterinary Journal*, 194(3), 423–424.
42. Garcia S. N., Osburn B. I. and Cullor J. S. (2019). A one health perspective on dairy production and dairy food safety. *One Health*, 7(November 2018), 100086.
43. Gomes F. and Henriques M. (2016). Control of Bovine Mastitis: Old and Recent Therapeutic Approaches. In *Current Microbiology* (Vol. 72, Issue 4, pp. 377–382). Springer New York LLC.
44. Gonçalves J. L., Hwa In Lee S., de Paula Arruda E., Pedroso Galles D., Camargo Caetano V., Fernandes de Oliveira C. A., Fernandes A. M. and Veiga dos Santos M. (2015). Biofilm-producing ability and efficiency of sanitizing agents against *Prototheca zopfii* isolates from bovine subclinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 98(6), 3613–3621.
45. Gonçalves J. L., Tomazi T., Barreiro J. R., Aparecida de Campos Braga P., Ferreira C. R., Pessoa Araújo Junior J., Eberlin M. N. and Veiga dos Santos M. (2014). Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Veterinary Microbiology*, 173(1–2), 147–151.
46. Gonçalves J. L., Tomazi T., Barreiro J. R., Beuron D. C., Arcari M. A., Lee S. H. I., Marlon de Magalhães Rodrigues Martins C. Pessoa Araújo Junior J. and Veiga dos Santos M. (2016). Effects of bovine subclinical mastitis caused by *Corynebacterium* spp. on somatic cell count, milk yield and composition by comparing contralateral quarters. *Veterinary Journal*, 209, 87–92.
47. Hagnestam-Nielsen C., Emanuelson U., Berglund B. and Strandberg E. (2009). Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *Journal of Dairy Science*, 92(7), 3124–3133.
48. Harmon R. J. (1994). Physiology of Mastitis and Factors Affecting Somatic Cell Counts. *Journal of Dairy Science*, 77(7), 2103–2112.
49. Hébert A., Sayasith K., Sénéchal, S., Dubreuil P. and Lagacé J. (2000). Demonstration of intracellular *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis alveolar cells and macrophages isolated from naturally infected cow milk. *FEMS microbiology letters*, 193(1), 57–62.

50. Heikkilä A.M., Nousiainen J.I. and Pyörälä S. (2012). Costs of clinical mastitis with special reference to premature culling. *J Dairy S*, 95(1), 139–150.
51. Hillerton E. and Booth J. M. (2018). The Five-Point Mastitis Control Plan-A Revisory Tutorial! *NMC Annual Meeting Proceedings, February*, 3–17.
52. Hillerton J. E. and Berry E. A. (2003). The management and treatment of environmental streptococcal mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 19(1), 157–169.
53. Hogan J. and Larry Smith K. (2003). Coliform mastitis. *Veterinary research*, 34(5), 507–519.
54. Holmes A. H., Moore L. S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A., Guerin P. J. and Piddock L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet* (London, England), 387(10014), 176–187.
55. Ishiyama D., Mizomoto T., Ueda C., Takagi N., Shimizu N., Matsuura Y., Makuuchi Y., Watanabe A., Shinozuka Y. and Kawai K. (2017). Factors affecting the incidence and outcome of *Trueperella pyogenes* mastitis in cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(3), 626–631.
56. Ismail Z. B. (2017). Mastitis vaccines in dairy cows: Recent developments and recommendations of application. *Veterinary world*, 10(9), 1057–1062.
57. Jagielski T., Buzzini P., Lassa H., Malinowski E., Branda E., Turchetti B., Polleichtner A., Roesler U., Lagneau P. E., Marques S., Silva E., Thompson G., Stachowiak R., and Bielecki J. (2012). Multicentre Etest evaluation of in vitro activity of conventional antifungal drugs against European bovine mastitis *Prototheca* spp. isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(8), 1945–1947.
58. Jagielski T., Gawor J., Bakula Z., Decewicz P., Maciszewski K. e Karnkowska A. (2018A). *Cytb* as a new genetic marker for differentiation of *prototheca* species. *Journal of Clinical Microbiology*;56(10):1–19.
59. Jagielski T., Niedzwiecka K., Roeske K. and Dylag M. (2018B). 3-Bromopyruvate As an Alternative Option for the Treatment of Protothecosis. *Frontiers in Pharmacology*; 9(APR).
60. Jagielski T., Roeske K., Bakula Z., Piech T., Wlazlo Ł., Bochniarz M., Woch P. and Krukowski H. (2019). A survey on the incidence of *Prototheca* mastitis in dairy herds in Lublin province, Poland. *Journal of Dairy Science*, 102(1), 619–628.

61. Jánosi S., Rátz F., Szigeti G., Kulcsár M., Kerényi J., Laukó T., Katona, F. and Huszenicza, G. (2001). Review of the microbiological, pathological, and clinical aspects of bovine mastitis caused by the alga *Prototheca zopfii*. *The veterinary quarterly*, 23(2), 58–61.
62. Jashari R., Piepers S. and De Vliegher S. (2016). Evaluation of the composite milk somatic cell count as a predictor of intramammary infection in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 99(11), 9271–9286.
63. Jayarao B. M., Pillai S. R., Sawant A. A., Wolfgang D. R. and Hegde N. V. (2004). Guidelines for monitoring bulk tank milk somatic cell and bacterial counts. *Journal of Dairy Science*, 87(10), 3561–3573.
64. Jørgensen H. J., Nordstoga A. B., Sviland S., Zadoks R. N., Sølvørød L., Kvitle B. and Mørk T. (2016). *Streptococcus agalactiae* in the environment of bovine dairy herds--rewriting the textbooks? *Veterinary microbiology*, 184, 64–72.
65. Käppeli N., Morach M., Zurfluh K., Corti S., Nüesch-Inderbinen M. and Stephan R. (2019). Sequence types and antimicrobial resistance profiles of *streptococcus uberis* isolated from bovine mastitis. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(JUL), 1–7.
66. Katholm J., Bennedsgaard T. W., Koskinen M. T. and Rattenborg E. (2012). Quality of bulk tank milk samples from Danish dairy herds based on real-time polymerase chain reaction identification of mastitis pathogens. *Journal of dairy science*, 95(10), 5702–5708.
67. Keefe G. (2012). Update on control of *staphylococcus aureus* and *streptococcus agalactiae* for management of mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 203–216.
68. Keefe G. P. (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 38(7), 429–437.
69. Kehrli M. E. and Harp J. A. (2001). Immunity in the mammary gland. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(3), 495–516.
70. Kitchen B., Middleton G. and Salmon M. (1978). Bovine milk N-acetyl- β -D-glucosaminidase and its significance in the detection of abnormal udder secretions. *Journal of Dairy Research*, 45(1), 15-20.
71. Köck R., Becker K., Cookson B., van Gemert-Pijnen J.E., Harbarth S., Kluytmans J., Mielke M., Peters G., Skov R.L., Struelens M.J., Tacconelli E., Navarro Torné A., Witte

- W. and Friedrich A.W. (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.*, 15 (41), pp. 1-9
72. Lago A., Godden S. M., Bey R., Ruegg P. L. and Leslie K. (2011). The selective treatment of clinical mastitis based on on-farm culture results: I. Effects on antibiotic use, milk withholding time, and short-term clinical and bacteriological outcomes. *Journal of Dairy Science*, 94(9), 4441–4456.
 73. Lam T. J. G. M., Olde Riekerink R. G. M., Sampimon O. C. and Smith H. (2009). Mastitis diagnostics and performance monitoring: A practical approach. *Irish Veterinary Journal*, 62(4), 34–39.
 74. Leigh J. A. (1999). *Streptococcus uberis*: A permanent barrier to the control of bovine mastitis? *Veterinary Journal*, 157(3), 225–238.
 75. Leslie K. E. and Petersson-Wolfe, C. S. (2012). Assessment and Management of Pain in Dairy Cows with Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 289–305.
 76. Li C., Sapugahawatte D. N., Yang Y., Wong K. T., Lo N. W. S. and Ip M. (2020). Multidrug-resistant *Streptococcus agalactiae* strains found in human and fish with high penicillin and cefotaxime non-susceptibilities. *Microorganisms*, 8(7), 1–10.
 77. Lundberg Å., Nyman A., Unnersta, H. E. and Waller K. P. (2014). Prevalence of bacterial genotypes and outcome of bovine clinical mastitis due to *Streptococcus dysgalactiae* and *Streptococcus uberis*. *Acta veterinaria Scandinavica*, 56, 80
 78. Magro G., Rebolini M., Berett D. and Piccinini R. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC22-MRSA-IV as an agent of dairy cow intramammary infections. *Vet Microbiol*, 227: 29–33.
 79. Mahmmod Y. S., Klaas I. C., Nielsen S. S., Katholm J. and Toft N. (2013). Effect of presampling procedures on real-time PCR used for diagnosis of intramammary infections with *Staphylococcus aureus* in dairy cows at routine milk recordings. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2226–2233.
 80. Marques S., Silva E., Kraft C., Carvalheira J., Videira A., Huss V.A.R. and Thompson G. (2008). Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *J Clin Microbiol.*:46(6):1941–5.

81. Marshall J.S., Warrington R., Watson W. and Kim H.L. (2018). An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clinical Immunology*; Sep 12;14(Suppl 2):49.
82. Martins S. A. M., Martins V. C., Cardoso F. A., Germano J., Rodrigues M., Duarte C., Bexiga R., Cardoso S. and Freitas P. P. (2019). Biosensors for on-farm diagnosis of mastitis. In *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* (Vol. 7, Numero JUL).
83. McAuliffe L., Ellis R. J., Miles K., Ayling R. D. and Nicholas R. A. J. (2006). Biofilm formation by mycoplasma species and its role in environmental persistence and survival. *Microbiology*, 152(4), 913–922.
84. McDougall S., Bryan M. A. and Tiddy R. M. (2009). Effect of treatment with the nonsteroidal antiinflammatory meloxicam on milk production, somatic cell count, probability of re-treatment, and culling of dairy cows with mild clinical mastitis. *Journal of Dairy Science*, 92(9), 4421–4431.
85. McEwen S. A. and Collignon P. J. (2018). Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology spectrum*, 6(2), 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.
86. Mendonça L. C., Gentilini M. B., Carvalho N. L., Malacco V. M. R., De Assis Lage C. F. and Molina L. R. (2017). Blitz therapy in control of *Streptococcus agalactiae* subclinical mastitis in dairy cows reduces somatic cells count of bulk milk tank in a dairy cattle herd. *Acta Veterinaria Brasilica*, 11(1), 1–5.
87. Monistero V., Graber H. U., Pollera C., Cremonesi P., Castiglioni B., Bottini E., Ceballos-Marque A., Lasso-Rojas L., Kroemker V., Wente N., Petzer I. M., Santisteban C., Runyan J., Veiga dos Santos M., Alves B. G., Piccinini R., Bronzo V., Abbassi M. S., Said M. Ben and Moroni P. (2018). *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in eight countries: Genotypes, detection of genes encoding different toxins and other virulence genes. *Toxins*, 10(6).
88. Mweu M. M., Nielsen S. S., Halasa T. and Toft N. (2012). Annual incidence, prevalence and transmission characteristics of *Streptococcus agalactiae* in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, 106(3–4), 244–250.
89. Nagasawa Y., Kiku Y., Sugawara K., Yabusaki N., Oono K., Fujii K., Suzuki T., Maehana K. and Hayashi T. (2020). Rapid *Staphylococcus aureus* Detection From Clinical Mastitis Milk by Colloidal Gold Nanoparticle-Based Immunochromatographic Strips. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(January), 1–12.

90. Neave F. K., Dodd F. H., Kingwil, R. G. and Westgarth D. R. (1969). Control of Mastitis in the Dairy Herd by Hygiene and Management. *Journal of Dairy Science*, 52(5), 696–707.
91. Nicholas R. A. J., Fox L. K. and Lysnyansky I. (2016). Mycoplasma mastitis in cattle: To cull or not to cull. *Veterinary Journal*, 216, 142–147.
92. Nickel R., Schummer A. and Seiferle E. (1992). Trattato di anatomia degli animali domestici, Casa Editrice Ambrosiana, VI ed., pp. 469-470 e 514-529.
93. Nickerson S.C. and Akers R.M. (2011). Mammary Gland | Anatomy. In: Fuquay J.W., Fox P.F. and McSweeney P.L.H. (eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Second Edition, vol. 3, pp. 328–337. San Diego: Academic Press.
94. Noorlander D. O., Heckmann R. A., Gardner R. W. and Checketts M. (1981). Milk gases, mastitis and milking machines. *Modern veterinary practice*, 62(8), 590–594.
95. Norberg E., Hogeveen H., Korsgaard I. R., Friggens N. C., Sloth K. H. M. N. and Løvendahl P. (2004). Electrical conductivity of milk: Ability to predict mastitis status. *Journal of Dairy Science*, 87(4), 1099–1107.
96. Olechnowicz J. and Jaśkowski J. M. (2012). Somatic cells count in cow's bulk tank milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(6), 681–686.
97. Palma E., Tilocca B. and Roncada, P. (2020). Antimicrobial resistance in veterinary medicine: An overview. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 1–21.
98. Pankey J. W. (1989). Premilking udder hygiene. *Journal of dairy science*, 72(5), 1308–1312.
99. Paudyal S., Melendez P., Manriquez D., Velasquez-Munoz A., Pena G., Roman-Muniz I. N. and Pinedo P. J. (2020). Use of milk electrical conductivity for the differentiation of mastitis causing pathogens in Holstein cows. *Animal*, 14(3), 588–596.
100. Pérez V. K. C., da Costa G. M., Guimarães A. S., Heinemann M. B., Lage A. P. and Dorneles E. M. S. (2020). Relationship between virulence factors and antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 22.
101. Perry J., Waglehner N. and Wright G. (2016). The Prehistory of Antibiotic Resistance. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a025197.

102. Petersson-Wolfe C. S, Mullarky I. K. and Jones G. M. (2010). Staphylococcus aureus Mastitis: Cause, Detection, and Control. *Virginia Cooperative Extension*, 404(229), 7.
103. Petzer I. M., Karzis J., Donkin E. F., Webb E. C. and Etter E. M. C. (2017). Somatic cell count thresholds in composite and quarter milk samples as indicator of bovine intramammary infection status. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 84(1), 1–10.
104. Piccinini R., Borromeo V. and Zecconi A. (2010). Relationship between Staphylococcus aureus gene pattern and dairy herd mastitis. *Vet. Microbiol.*, 145, 100–105.
105. Pilla R., Malvisi M., Snel G. G. M., Schwarz D., König S., Czerny C. P. and Piccinini R. (2013). Differential cell count as an alternative method to diagnose dairy cow mastitis. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1653–1660.
106. Piepers S., De Meulemeester L., De Kruif A., Opsomer G., Barkema H. and De Vliegher S. (2007). Prevalence and distribution of mastitis pathogens in subclinically infected dairy cows in Flanders, Belgium. *Journal of Dairy Research*, 74(4), 478-483.
107. Pinzón-Sánchez C., Cabrera V. E. and Ruegg P. L. (2011). Decision tree analysis of treatment strategies for mild and moderate cases of clinical mastitis occurring in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 94(4), 1873–1892.
108. Punyapornwithaya V., Fox L. K., Hancock D. D., Gay J. M. and Richard Alldredge J. (2012). Time to clearance of mycoplasma mastitis: The effect of management factors including milking time hygiene and preferential culling. *Canadian Veterinary Journal*, 53(10), 1119–1122.
109. Pyörälä S. (2002). New strategies to prevent mastitis. *Reproduction in Domestic Animals*, 37(4), 211–216.
110. Pyörälä S. and Taponen S. (2009). Coagulase-negative staphylococci-Emerging mastitis pathogens. *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 3–8.
111. Rainard P. (2003). The complement in milk and defense of the bovine mammary gland against infections. *Veterinary research*, 34(5), 647–670.
112. Reyes J., Chaffer M., Sanchez J., Torres G., Macias D., Jaramillo M., Duque P. C., Ceballos A. and Keefe G. P. (2015). Evaluation of the efficacy of intramuscular versus intramammary treatment of subclinical Streptococcus agalactiae mastitis in dairy cows in Colombia. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5294–5303.

113. Roberson J. R. (2012). Treatment of Clinical Mastitis. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 28(2), 271–288.
114. Roberson J. R., Fox L. K., Hancock D. D., Gay J. M. and Besser T. E. (1994). Ecology of *Staphylococcus aureus* Isolated from Various Sites on Dairy Farms. *Journal of Dairy Science*, 77(11), 3354–3364.
115. Roesler U., Möller A., Hensel A., Baumann D. and Truyen U. (2006). Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: a proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56:1419–1425.
116. Royster E. and Wagner S. (2015). Treatment of Mastitis in Cattle. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 31(1), 17–46.
117. Ruegg P. L. (2017). A 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10381–10397.
118. Ruegg P. L. and Pantoja J. C. F. (2013). Understanding and using somatic cell counts to improve milk quality. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*, 52(2 SPEC. ISSUE 2), 101–117.
119. Ryman V. E., Nickerson S. C., Hurley D. J., Berghaus R. D. and Kautz F. M. (2013). Influence of horn flies (*Haematobia irritans*) on teat skin condition, intramammary infection, and serum anti-*S. aureus* antibody titres in holstein heifers. *Research in Veterinary Science*, 95(2), 343–346.
120. Sandgren C. H., Waller K. P. and Emanuelson U. (2008). Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *Veterinary Journal*, 175(1), 108–117.
121. Schrick F.N., Hockett M.E., Saxton A.M., Lewis M.J., Dowlen H.H. and Oliver S.P. (2001). Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy S*, 84(6), 1407–1412.
122. Schukken Y. H., González R. N., Tikofsky L. L., Schulte H. F., Santisteban C. G., Welcome F. L., Bennett G. J., Zurakowski M. J. and Zadoks R. N. (2009). CNS mastitis: Nothing to worry about? *Veterinary Microbiology*, 134(1–2), 9–14.
123. Scott P. R., Penny C. D. and Macrae A. I. (2011). Cattle Medicine. Manson Publishing/The Veterinary Press; 1st edition. Cap. 11 pp. 216-236

124. Sears P. M., Smith B. S., English P. B., Herer P. S. and Gonzalez R. N. (1990). Shedding pattern of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infections. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 2785–2789.
125. Seinhorst J. W., Sol J. and Vecht U. (1991). Effect of damage to the teat end on the experimental induction of mastitis in dry cows with *Corynebacterium pyogenes*. *The Veterinary record*, 128(3), 54–56.
126. Smith B. P. (2015). Large Animal Internal Medicine. Elsevier; 5th edition. Cap. 36 pp. 1015-1043.
127. Smith K. L., Hogan J. S. and Weiss W. P. (1997). Dietary Vitamin E and Selenium Affect Mastitis and Milk Quality. *Journal of Animal Science*, 75(6), 1659–1665.
128. Snel G. G. M., Malvisi M., Pilla R. and Piccinini R. (2014). Evaluation of biofilm formation using milk in a flow cell model and microarray characterization of *Staphylococcus aureus* strains from bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 174(3–4), 489–495.
129. Sordillo L. M. and Streicher K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 7:135–146.
130. Spencer S. B. (1989). Recent Research and Developments in Machine Milking—A Review. *Journal of Dairy Science*, 72(7), 1907–1917.
131. Sultan I., Rahman S., Jan A. T., Siddiqui M. T., Mondal A. H. and Haq Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP).
132. Tenhagen B. A., Köster G., Wallmann J. and Heuwieser W. (2006). Prevalence of mastitis pathogens and their resistance against antimicrobial agents in dairy cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science*, 89(7), 2542–2551.
133. Tomita T., Meehan B., Wongkattiya N., Malmo J., Pullinger G., Leigh J. and Deighton M. (2008). Identification of *Streptococcus uberis* multilocus sequence types highly associated with mastitis. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 114–124.
134. Truchetti G., Bouchard E., Descôteaux L., Scholl D. and Roy J. P. (2014). Efficacy of extended intramammary ceftiofur therapy against mild to moderate clinical mastitis in Holstein dairy cows: a randomized clinical trial. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 78(1), 31–37.

135. Vasquez A. K., Nydam D. V., Foditsch C., Wieland M., Lynch R., Eicker S. and Virkler P. D. (2018). Use of a culture-independent on-farm algorithm to guide the use of selective dry-cow antibiotic therapy. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5345–5361.
136. Verbeke J., Piepers S., Supré K. and De Vliegher S. (2014). Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6926–6934.
137. Wang X., Ten, D., Wang X., Hao Y., Chen H., Mao R. and Wang J. (2019). Internalization, distribution, and activity of peptide H2 against the intracellular multidrug-resistant bovine mastitis-causing bacterium *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12.
138. Williamson J. H. and Lacy-Hulbert S. J. (2013). Effect of disinfecting teats post-milking or pre- and post-milking on intramammary infection and somatic cell count, *New Zealand Veterinary Journal*, 61:5, 262-268.
139. Winder C. B., Sargeant J. M., Kelton D. F., Leblanc S. J., Duffield T. F., Glanville J., Wood H., Churchill K. J., Dunn J., Bergevin M. D., Dawkins K., Meadows S. and O'Connor A. M. (2019). Comparative efficacy of blanket versus selective dry-cow therapy: a systematic review and pairwise meta-analysis. *Animal health research reviews*, 20(2), 217–228.
140. Zachary J. F. (2017). *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Elsevier; 6th ed.; Cap 18, pp. 1183-1187.
141. Zaini F., Kanani A., Falahati M., Fateh R., Salimi-Asl M., Saemi N., Farahyar S., Kheirabad A. and Nazeri M. (2012). Identification of *Prototheca zopfii* from bovine mastitis. *Iran Journal of Public Health*;41(8):84–88.
142. Zeconi A. and Zanirato G. (2013). Il controllo delle mastiti per un allevamento sostenibile. Litografia SAB-Budrio (BO), pp. 1-69.
143. Zeconi A., Dell'Orco F., Rizzi N., Vairani D., Cipolla M., Pozzi P. and Zanini L. (2020). Cross-sectional study on the prevalence of contagious pathogens in bulk tank milk and their effects on somatic cell counts and milk yield. In *Italian Journal of Animal Science* (Vol. 19, Numero 1, pagg. 66–74).
144. Zhao X. and Lacasse P. (2008). Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. *Journal of Animal Science*, 86(13 Suppl), 57–65.

9. Fonti normative

1. Direttiva 92/46/CEE del Consiglio del 16 giugno 1992 che stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione di latte crudo, di latte trattato termicamente e di prodotti a base di latte.
2. Decreto Legislativo 6 aprile 2006, n. 193: “Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari”
3. Decreto del Ministero della Salute 7 dicembre 2017 – “Sistema di reti di epidemio-sorveglianza, compiti, responsabilità e requisiti professionali del veterinario aziendale” (Gazzetta ufficiale - Serie Generale - n.29 del 5 febbraio 2018).

10. Sitografia

1. Categorisation of antibiotics in the European Union. 12 December 2019
EMA/CVMP/CHMP/682198/2017.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
2. Commission proposes a ban on the use of some antibiotics as animal feed additives.
IP/98/1085. https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/IP_98_1085
<https://www.alimenti-salute.it/content/linee-guida-uso-dellantibiotico-nellallevamento-bovino-latte>
https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf
3. Linee guida per l'uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell'antimicrobico-resistenza e proposte alternative. Sezione per la Farmacosorveglianza sui Medicinali Veterinari Ministero Della Salute.
http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2782_allegato.pdf
4. Linee Guida Uso dell'antibiotico nell'allevamento bovino da latte, Regione Emilia Romagna, 2018.
5. Ministero della Salute, Nota 21 gennaio 2019: Antimicrobicoresistenza indicazioni cogenti. <https://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/dettaglioAtto?id=67719>
6. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. Trends from 2010 to 2018. Tenth ESVAC report. 21 October 2020 EMA/24309/2020
7. World Health Organization, Antimicrobial Resistance; 13/10/2020.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>

Ringraziamenti

Grazie ai miei genitori Mauro e Giovanna, che in questi anni mi hanno sempre supportato e incoraggiato (e hanno pagato le tasse). Grazie a mio fratello Francesco per l'aiuto e i momenti di svago.

Grazie agli amici scout, compagni di vita da ormai molti anni, con cui ho passato momenti lieti che mi hanno aiutato a staccare dallo studio.

Grazie ai compagni delle superiori per i ritrovi molesti e per i milioni di messaggi che puntualmente non leggevo.

Grazie ai colleghi dell'università per tutti gli appunti rubati e prestati, per gli spritz a orari improbabili e per tutte le difficoltà che abbiamo superato insieme. In particolare devo ringraziare Mirko (che altrimenti si offende), con cui sono stato “culo e camicia” questi cinque anni, e Claudia (che altrimenti si offende ancora di più) con cui ho affrontato momenti duri e durissimi, ma sempre con un meme pronto.

Grazie a Martina per la pazienza, il supporto e l'affetto che mi ha dato, specialmente nel periodo di stesura della Tesi.

Un ringraziamento a tutti i docenti che hanno contribuito a far vivere questo percorso come parte di una grande famiglia e anche a quelli che non l'hanno fatto (grazie Masca).

Grazie al prof. Giancesella per la pazienza e l'assistenza che mi ha dato in questo periodo, ma soprattutto per tutte le cose che esulano dalla tesi.

Un ringraziamento speciale lo devo a Rossella, per l'enorme aiuto che mi ha dato nel campionamento, nella stesura della Tesi e in mille altre cose.